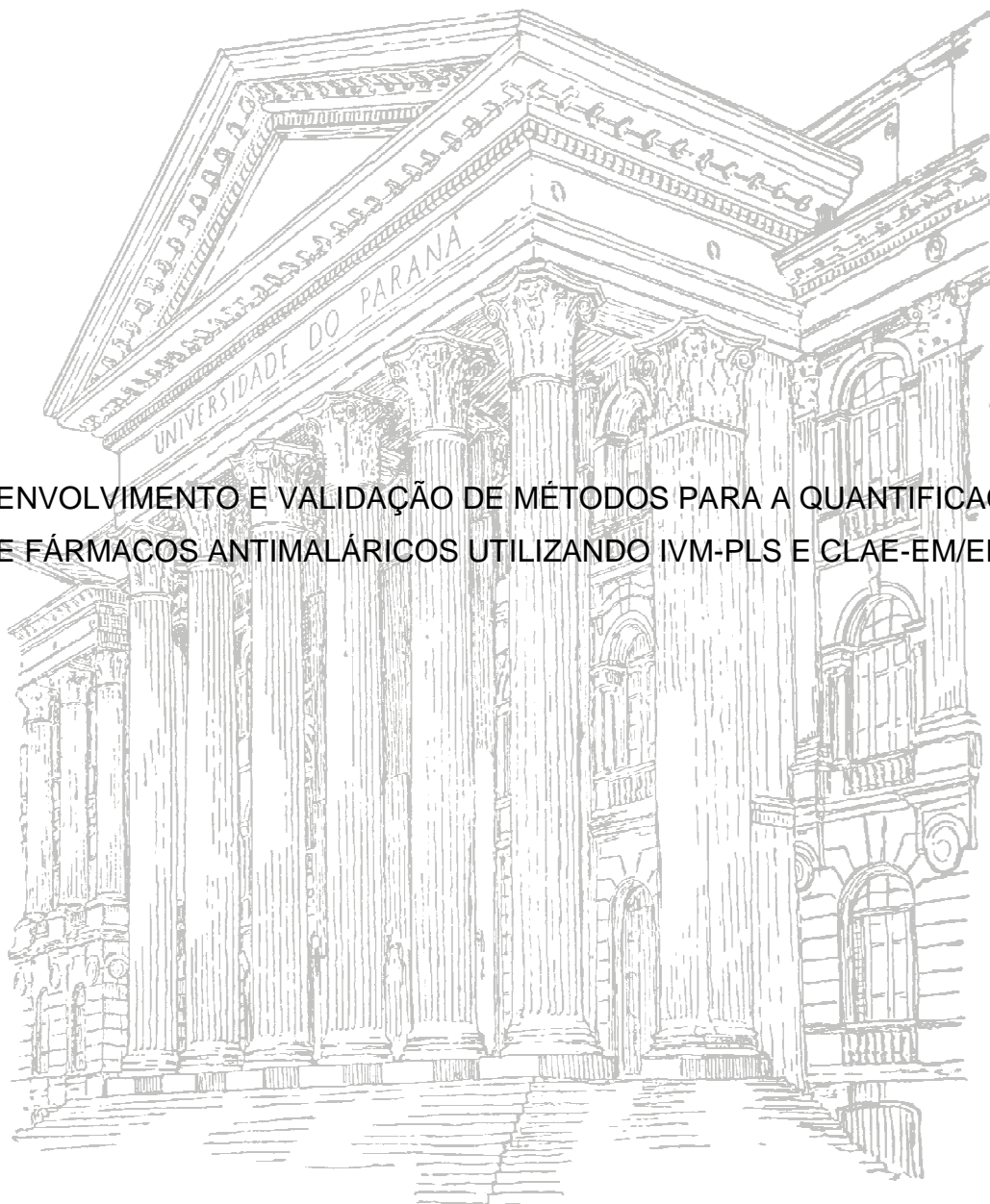


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRENO MAURÍCIO MARSON

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO  
DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS UTILIZANDO IVM-PLS E CLAE-EM/EM



CURITIBA  
2015

BRENO MAURÍCIO MARSON

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO  
DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS UTILIZANDO IVM-PLS E CLAE-EM/EM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Coorientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini

**CURITIBA**  
**2015**

Marson, Breno Maurício  
Desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação de fármacos antimaláricos utilizando IVM-PLS e CLAE-EM/EM / Breno Maurício Marson. - Curitiba, 2015.  
129 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo  
Coorientador: Professor Dr. Mário Sérgio Piantavini  
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Artesunato. 2. Mefloquina. 3. CLAE-EM/EM. 4. Infravermelho médio. 5. Calibração multivariada. 6. PLS. 7. Validação analítica. I. Pontarolo, Roberto. II. Piantavini, Mário Sérgio. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 615.1901

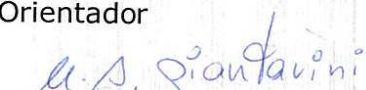
## **TERMO DE APROVAÇÃO**


**BRENO MAURÍCIO MARSON**


**Título: "DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIMALÁRICOS UTILIZANDO IVM-PLS E CLAE-EM/EM"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.

  
Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Orientador

  
Prof. Dr. Mário Sérgio Piantavini  
Co-orientador

  
Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves  
Universidade Federal do Paraná

  
Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Curitiba, 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabalho à minha Família.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida e saúde, por iluminar meu caminho e me proteger nessas idas e vindas, e assim, possibilitar-me condições de trabalhar na busca dos meus sonhos.

Aos meus pais, Maurício Marson e Maria Nilze Guerino Marson, pelo amor incondicional, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Também amo vocês.

A minha esposa Raquel de Oliveira Vilhena, que tem todo o meu amor e admiração, por todo amor, paciência e compreensão. Obrigado por todo incentivo e apoio durante esses anos, por tornar minha vida completa e muito mais feliz. Faço minhas as suas palavras, pois não encontraria maneira melhor de expressar meu amor e admiração, apenas de igual forma em sua infinidade.

A minhas irmãs Tatiana Guerino Marson e Poliana Guerino Marson Ascencio, pelo amor e afeto, pela dedicação, apoio e incentivo. Poucas pessoas têm a sorte de na vida terem tão boas referências nas quais se espelhar, graças a vocês posso dizer que sou uma delas.

Ao meu orientador Professor Dr. Roberto Pontarolo, por toda a confiança, apoio, compreensão e paciência em mim depositada. Obrigado pela oportunidade de aprendizado, por acreditar e contribuir na realização desse trabalho.

Ao meu coorientador Professor Dr. Mário Sérgio Piantavini, por todo o incentivo e dedicação na realização desse trabalho.

Em especial às amigas Camilla R. S. Madeira e Flávia L. Degaut por me apoiarem com seus conhecimentos, experiências, conselhos, e por não se importarem em deixar seus afazeres de lado para me ajudar, sempre com muita paciência e dedicação.

Aos colegas de pós-graduação, Caroline Paola Uber, Cleverson A. F. Martins, João C. Gasparetto, Letícia C. Bonâncio, Letícia P. Leonart, Luna Assis, Rômulo P. Ribeiro, Thais M. G. de Francisco e Professora Dra. Francinete R. Campos, sempre solícitos e dispostos a ajudar.

Aos amigos, afilhados e também padrinhos Thiago César Avelino do Vale e Joice Mendes Silva, pela grande amizade, por toda a ajuda e hospitalidade em me receber em sua casa sempre que necessário, mesmo que as vezes por uma semana inteira ou duas.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização desse trabalho. Muito obrigado!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

*"Quando se sonha sozinho é apenas um sonho. Quando se sonha junto é  
o começo da realidade."*

*Miguel de Cervantes*



## RESUMO

Mundialmente reconhecida como um grave problema de saúde pública, a malária acomete principalmente países das regiões tropicais do mundo. Atualmente a terapia combinada à base de artesunato (ARS) e mefloquina (MFQ) é considerada o tratamento de primeira escolha para malária por *P. falciparum*, sendo recomendada desde 2002 pela OMS e 2006 pelo Ministério da Saúde. Dentre os vários obstáculos ao tratamento, um que tem contribuído para o desenvolvimento de cepas resistentes é a incidência do uso de medicamentos de má qualidade. Apesar dessa terapia ser recomendada desde 2002, compêndios oficiais como farmacopeias não descrevem métodos de análise para essa associação e a literatura científica ainda é muito escassa de publicações com métodos de referência em análises de controle de qualidade. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos por CLAE-EM/EM e por espectroscopia no infravermelho médio associado à calibração multivariada (IVM-PLS), capazes de quantificar simultaneamente a associação dos fármacos ARS e MFQ. A primeira técnica é sensível e seletiva, ideal para quantificação simultânea dos fármacos, já a segunda é uma técnica simples, rápida, sem uso de solventes orgânicos e de baixo custo. O método por CLAE-EM/EM foi operado com interface *electrospray*, no modo positivo de ionização através de um detector do tipo quadrupolo. A cromatografia foi realizada em coluna XBridge C18 (2,1x50 mm; 5  $\mu$ m), a fase móvel consistiu em água:acetonitrila:metanol:ácido fórmico (30:35:35:0,1 v/v/v/v), fluxo de 0,35 mL.min<sup>-1</sup> em modo de eluição isocrática. A validação foi realizada de acordo com legislação vigente (ANVISA), mostrando-se seletivo, linear ( $r > 0,99$ ), preciso (DPR < 5%) e exato (recuperação entre 95 e 105%). O método por IVM-PLS foi operado no modo de refletância difusa, na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, 32 scans e temperatura e umidade controladas. Na construção do modelo foram utilizados planejamentos experimentais para desenvolver e validar o método, os dados foram tratados matematicamente no *software* PLS-Toolbox 3.0 que opera em ambiente Matlab 7.01. O melhor modelo foi por regressão por mínimos quadrados parciais - PLS com a combinação dos pré-processamentos: 1º derivada com alisamento Savitzky-Golay, seguido de correção do espalhamento de luz e dados centrados na média. A validação cruzada foi feita utilizando o método *leave-one-out*. O modelo foi construído com o uso de 3 variáveis latentes, proporcionando RMSEP inferior a 1,93 mg.100 mg<sup>-1</sup> para os dois analitos. O método foi validado de acordo com os respectivos regulamentos nacionais (ANVISA) e internacionais (ASTM E1655-05) através da estimativa de figuras de mérito, tais como exatidão, precisão, linearidade, sensibilidade analítica, seletividade, *bias* e desvio residual da predição. Na avaliação das amostras comerciais os métodos desenvolvidos forneceram resultados estatisticamente equivalentes, apresentando valores de *p* superiores a 0,05 e valores de *t* calculados inferiores aos valores de *t* crítico (nível confiança: 95%). Os métodos desenvolvidos se mostraram adequados para o controle de qualidade desses fármacos, podendo ser aplicados na rotina de laboratórios que prestam serviços de controle de qualidade, bem como na indústria no controle de processo, além de análises fiscais.

Palavras-chave: Artesunato, Mefloquina, CLAE-EM/EM, Infravermelho Médio, Calibração Multivariada, PLS, Validação Analítica.

## ABSTRACT

Widely recognized as a serious public health problem, malaria affects mainly countries in tropical regions of the world. Currently, the combination therapy of artesunate (ARS) and mefloquine (MFQ) is the first choice treatment for *P. falciparum* malaria, and it is recommended by the World Health Organization since 2002 and by Brazilian Ministry of Health since 2006. Among the treatment barriers, one that has contributed to the development of drug-resistant strains is the incidence of the use of low quality drugs. Although this therapy is recommended since 2002, there is non-pharmacopoeic method devoted to this drug combination and studies about quality control methods are still scarce. For this reason, the present work was devoted to the development and validation of methods for simultaneous determination of ARS and MFQ by LC-MS/MS and by infrared spectroscopy with multivariate calibration (PLS-MIR). The first technique is selective and sensible, ideal for simultaneous determination of the analytes and the second one is simple, rapid, solvent free, and low cost. The analyses by LC-MS/MS were carried out with a triple quadrupole spectrometer equipped with an electrospray source, operated in positive ion mode. The chromatography used a XBridge column C18 (2,1x50 mm; 5  $\mu$ m), mobile phase of water:acetonitrile:methanol:formic acid (30:35:35:0,1 v/v/v/v), at flow rate of 350  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>, and isocratic elution. Validation was performed according to the current legislation (ANVISA), the method was selective, linear ( $r>0,99$ ), precise (RSD<5%) and accurate (recovery ranging from 95-105%). PLS-MIR method was carried out by diffuse reflectance mode and the spectra were recorded from 4000 to 400 cm<sup>-1</sup> as the average of 32 scans, with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup> under controlled humidity and temperature. Experimental design was used for model development and validation, data were handled using PLS-Toolbox 3.0 software operated in MATLAB 7.01 environment. The best model was obtained using partial least squares – PLS2 and preprocessed by 1st Derivative and Savitzky-Golay smoothing plus multiplicative scatter correction (MSC) followed by mean center. The cross validation was performed using leave-one-out method. The model was developed using 3 latent variables, providing RMSEP<1.93 mg.100 mg<sup>-1</sup> for both analytes. The method was validated according to current legislation (ANVISA) and international recommendations (ASTM E1655-05) through the estimate of figures of merit such as accuracy, precision, linearity, analytical sensitivity, selectivity, bias, and residual prediction deviation (RDP). When analyzing commercial samples, LC-MS/MS and PLS-MIR methods provided statistically equivalent results, with *p*-values greater than 0.05 and calculated *t* values less than critical *t* values (confidence interval: 95%). The developed methods were suitable for quality control of these drugs and can be applied in laboratorial quality control routine, in-process control, besides fiscal analysis.

**Key words:** Artesunate, Mefloquine, LC-MS/MS, Medium Infrared, Multivariate calibration, PLS, Analytical Validation.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DO <i>Plasmodium</i> .....	28
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ARTESUNATO.....	33
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MEFLOQUINA.....	34
FIGURA 4 - REFLETÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR.....	44
FIGURA 5 - (a) MATRIZ DE VARIÁVEIS INDEPENDENTES, POR EXEMPLO DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS; (b) MATRIZ DE VARIÁVEIS DEPENDENTES, POR EXEMPLO DADOS DE CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA.....	47
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR NAS.....	62
FIGURA 7 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ARTESUNATO (A), MEFLOQUINA (B) E INDOMETACINA (C).....	68
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA.....	83
FIGURA 9 - ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 410 $m/z$ ) PARA VERIFICAÇÃO DE ADUTOS DO ARTESUNATO.....	91
FIGURA 10 - INTENSIDADE DE SINAL DOS IONS PRECURSORES DOS ANALITOS DE INTERESSE E PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ADITIVOS.....	92
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE PADRÕES NO MÉTODO FINAL.....	97
FIGURA 12 - CROMATOGRAMAS DE AVALIAÇÃO DE EFEITO RESIDUAL OBTIDOS POR CLAE-EM/EM: BRANCO (B1) E PRIMEIRA (B2) E SEGUNDA (B3) INJEÇÕES DE BRANCO APÓS INJEÇÃO DA AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO LSQ.....	98
FIGURA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO DE ARTESUNATO.....	100
FIGURA 14 - COMPARAÇÃO ENTRE CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO DE MEFLOQUINA.....	100

FIGURA 15 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA.....	102
FIGURA 16 - GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA O ARTESUNATO E MEFLOQUINA.....	103
FIGURA 17 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (---) E VALIDAÇÃO (----).....	108
FIGURA 18 - ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DO BRANCO (CELA SEM ANALITOS).....	109
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR IVM.....	111
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA RELAÇÃO ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 PARA ARTESUNATO (ARS).....	113
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA RELAÇÃO ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA <i>VERSUS</i> VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 PARA MEFLOQUINA (MFQ).....	113

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA A DETERMINAÇÃO DE ARTESUNATO E/OU MEFLOQUINA POR TÉCNICAS DE INFRAVERMELHO OU ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	37
QUADRO 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE.....	54
QUADRO 3 - ENSAIOS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE.....	55
QUADRO 4 - DESCRIÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE COMPRIMIDOS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DE ARTESUNATO + MEFLOQUINA.....	67
QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS UTILIZADAS...	68
QUADRO 6 - PROPORÇÕES DE ADITIVOS TESTADAS NA AVALIAÇÃO DOS SINAIS DOS ANALITOS.....	72
QUADRO 7 - QUANTIDADE DE PADRÕES ANALÍTICOS ADICIONADOS E CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NOS DIFERENTES NÍVEIS DA CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO.....	76
QUADRO 8 - CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NOS DIFERENTES NÍVEIS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	77
QUADRO 9 - QUANTIDADE DE PADRÕES ANALÍTICOS ADICIONADOS PARA OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO.....	79

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	SUGESTÃO DE COMPOSIÇÃO PERCENTUAL QUANTITATIVA DOS COMPONENTES PRESENTES NO COMPRIMIDO.....	81
TABELA 2 -	QUANTIDADES UTILIZADAS DE ARTESUNATO, MEFLOQUINA E EXCIPIENTES NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO (25 AMOSTRAS).....	84
TABELA 3 -	QUANTIDADES UTILIZADAS DE ARTESUNATO, MEFLOQUINA E EXCIPIENTES NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (12 AMOSTRAS).....	85
TABELA 4 -	PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE CADA ANALITO.....	93
TABELA 5 -	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	94
TABELA 6 -	COMPARAÇÃO ENTRE COEFICIENTES ANGULARES DA CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO.....	101
TABELA 7 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA.....	103
TABELA 8 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR CLAE-EM/EM.....	104
TABELA 9 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR CLAE-EM/EM.....	105
TABELA 10 -	RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE.....	106
TABELA 11 -	RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES TRABALHO.....	107
TABELA 12 -	RESUMO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA O MELHOR MODELO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR IVM.....	111

TABELA 13 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR MÉTODO IVM-PLS2.....	115
TABELA 14 - RESUMO DOS PARÂMETROS ESTIMADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO IVM-PLS2.....	117
TABELA 15 - VALORES MÉDIOS DE CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO (dp) NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA EM COMPRIMIDOS COMERCIAIS ATRAVÉS DE IVM-PLS2 E CLAE-EM/EM (n = 5).....	118

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACT	- Terapia combinada à base de derivados de artemisinina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	- <i>American Society for Testing and Materials</i>
APCI	- Ionização química a pressão atmosférica
API	- Ionização a pressão atmosférica
CAD	- Gás de colisão
CCD	- Composto central completo
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de entrada na cela de colisão
CUR	- Gás de interface
CXP	- Potencial de saída da cela de colisão
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-APCI-EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização química à pressão atmosférica
CLAE-DESI-EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização <i>electrospray</i> por dessorção
CLAE-EM/EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massas sequencial
CLAE-ESI-EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização <i>electrospray</i>
CLAE-ESI-EM/EM	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial e fonte de ionização <i>electrospray</i>
CV	- Coeficiente de variação
DAD	- Detector de arranjos de diodo
DC	- Corrente de voltagem
dp	- Desvio padrão



DP	- Potencial de desagrupamento
DP <sub>cal</sub>	- Desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de calibração no cálculo de RDP
DP <sub>val</sub>	- Desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de validação no cálculo de RDP
DPR	- Desvio padrão relativo
DRIFTS	- Espectrometria de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier
EM	- Espectrometria de massas
EM/EM	- Espectrometria de massas sequencial
EP	- Potencial de entrada
ESI	- Ionização por <i>electrospray</i>
FT	- Transformada de Fourier
FTIR	- Infravermelho por transformada de Fourier
GS1	- Gás de nebulização
GS2	- Gás auxiliar
IC	- Intervalo de confiança
ICH	- <i>International Conference of Harmonization</i>
<i>PLS</i>	- <i>Interval partial least squares</i>
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IS	- Voltagem do capilar
IVM	- Infravermelho médio
IVP	- Infravermelho próximo
IUPAC	- <i>International of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	- Limite de detecção
LIQ	- Limite inferior de quantificação
LQ	- Limite de quantificação

LSQ	- Limite superior de quantificação
MRM	- Monitoramento de reações múltiplas
MSC	- Correção do espalhamento multiplicativo
m/z	- Razão massa carga
NAS	- Sinal analítico líquido
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PI	- Padrão interno
PLS	- Regressão por mínimos quadrados parciais
PLS2	- Regressão por mínimos quadrados parciais para dois fármacos ou mais
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
Q-Trap	- Espectroscopia de massa híbrida de quadrupolo com armadilha de íons
r	- Coeficiente de correlação
RDC	- Resolução de Diretoria Colegiada
RE	- Resolução
RMSEC	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração
RMSEP	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão
RMSECV	- Raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada
RPD	- Desvio residual de previsão
RF	- Radio frequência
SDV	- Desvio padrão dos erros de validação
SEL	- Seletividade
SEN	- Sensibilidade
siPLS	- <i>Synergy interval partial least squares</i>
SNV	- Variação normal padrão
TOF	- Tempo de voo
UV	- Ultravioleta

VL

- Variáveis latentes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 OBJETIVO GERAL.....	26
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
2.1 MALÁRIA.....	27
2.1.1 Agente etiológico, ciclo biológico, patogenia e sintomas.....	27
2.1.2 Epidemiologia da malária.....	29
2.1.3 Tratamento da malária causada por <i>P. falciparum</i> .....	30
2.1.4 Resistência ao tratamento com antimaláricos.....	31
2.2 ANTIMALÁRICOS.....	32
2.2.1 Artemisinina e seu derivado artesunato.....	32
2.2.2 Mefloquina.....	34
2.3 QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS USADOS NO TRATAMENTO DA MALÁRIA.....	35
2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE ARS E MFQ.....	36
2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL (CLAE-EM/EM).....	39
2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO.....	41
2.7 QUIMIOMETRIA.....	45
2.7.1 Calibração multivariada.....	46
2.7.1.1 PLS.....	46
2.7.1.2 Planejamento experimental.....	49
2.7.1.3 Seleção do número de variáveis latentes.....	50
2.7.1.4 Validação cruzada.....	51
2.7.1.5 Pré-processamento.....	51

2.7.1.6 Detecção de <i>outliers</i> .....	52
2.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	53
2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM).....	54
2.8.1.1 Seletividade e especificidade.....	55
2.8.1.2 Linearidade e curva de calibração.....	56
2.8.1.3 Intervalo.....	57
2.8.1.4 Precisão.....	57
2.8.1.5 Exatidão.....	57
2.8.1.6 Robustez.....	59
2.8.1.7 Estabilidade das soluções.....	59
2.8.1.8 Efeito residual ( <i>carryover</i> ).....	60
2.8.2 Calibração multivariada e infravermelho médio.....	60
2.8.2.1 Seletividade.....	61
2.8.2.2 Linearidade.....	62
2.8.2.3 Sensibilidade.....	63
2.8.2.4 Sensibilidade analítica.....	63
2.8.2.5 Precisão.....	64
2.8.2.6 Exatidão.....	64
2.8.2.7 Viés.....	65
2.8.2.8 Desvio residual de predição.....	66
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
3.1 MATERIAL.....	67
3.1.1 Amostra comercial de comprimidos de artesunato e mefloquina.....	67
3.1.2 Padrões analíticos.....	67
3.1.3 Reagentes e solventes.....	68
3.1.4 Consumíveis e equipamentos.....	69

3.1.5 Softwares.....	69
3.2 MÉTODO CLAE-EM/EM.....	70
3.2.1 Avaliação da solubilidade dos padrões analíticos.....	70
3.2.2 Preparo das soluções estoque dos padrões analíticos.....	70
3.2.3 Preparo da solução amostra.....	70
3.2.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	71
3.2.4.1 Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas.....	71
3.2.4.2 Monitoramento de reações múltiplas – MRM.....	72
3.2.4.3 Análise por injeção em fluxo – FIA.....	72
3.2.5 Otimização dos parâmetros cromatográficos.....	73
3.2.5.1 Preparo da fase móvel.....	73
3.2.5.2 Otimização da cromatografia.....	73
3.2.6 Teste de efeito residual ( <i>carryover</i> ).....	74
3.2.7 Otimização do preparo da amostra.....	74
3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	75
3.3.1 Seletividade.....	75
3.3.2 Curva de calibração e intervalo.....	76
3.3.3 Precisão.....	77
3.3.4 Exatidão.....	78
3.3.5 Teste de estabilidade.....	79
3.3.5.1 Teste de estabilidade das soluções estoque.....	79
3.3.5.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho.....	80
3.4 MÉTODO POR IVM-PLS.....	80
3.4.1 Seleção dos excipientes.....	80
3.4.2 Planejamento experimental.....	81
3.4.3 Preparo das amostras para a construção do modelo multivariado.....	83

3.4.4 Aquisição dos espectros de infravermelho.....	85
3.4.5 Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração.....	85
3.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR IVM-PLS.....	86
3.5.1 Seletividade.....	86
3.5.2 Linearidade.....	87
3.5.3 Sensibilidade e sensibilidade analítica.....	87
3.5.4 Precisão.....	87
3.5.5 Exatidão.....	88
3.5.6 Viés e desvio residual de predição.....	88
3.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS.....	89
3.6.1 Análise por calibração multivariada e infravermelho médio.....	89
3.6.2 Análise pelo método CLAE-EM/EM.....	89
3.6.3 Comparação da concordância de resultados entre métodos.....	89
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS PADRÕES ANALÍTICOS.....	90
4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.....	90
4.2.1 Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas.....	90
4.2.2 Monitoramento de reações múltiplas – MRM.....	93
4.2.3 Análise por injeção em fluxo – FIA.....	94
4.3 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	94
4.3.1 Otimização da cromatografia.....	94
4.3.2 Teste de efeito residual ( <i>carryover</i> ).....	97
4.3.3 Otimização do preparo da amostra.....	99
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM.....	99
4.4.1 Seletividade.....	99

4.4.2 Linearidade e intervalo.....	101
4.4.3 Precisão.....	104
4.4.4 Exatidão.....	105
4.4.5 Teste de estabilidade.....	106
4.4.5.1 Teste de estabilidade das soluções estoque.....	106
4.4.5.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho.....	107
4.5 MODELOS DESENVOLVIDOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	108
4.5.1 Obtenção do modelo por calibração multivariada no infravermelho médio (IVM).....	108
4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	111
4.6.1 Seletividade.....	112
4.6.2 Linearidade.....	112
4.6.3 Sensibilidade e sensibilidade analítica.....	114
4.6.4 Precisão.....	114
4.6.5 Exatidão.....	115
4.6.6 Viés e desvio residual de predição.....	116
4.6.7 Quantificação dos fármacos nas amostras reais.....	117
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>120</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo a infecção por *P. vivax* e *P. falciparum* as mais comuns (RANG *et al.*, 2005). Mundialmente reconhecida como um grave problema de saúde pública, a malária acomete principalmente países das regiões tropicais do mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS, no ano de 2013, cerca de 3,2 bilhões de pessoas encontravam-se sob o risco de contrair a malária, estimando-se aproximadamente 198 milhões de casos e 584 mil mortes ao redor do mundo (WHO, 2014). No Brasil, no ano de 2011, foram reportados cerca de 265 mil casos, desses, 98% foram transmitidos na região da Amazônia Legal, sendo *P. vivax* responsável por 87% dos casos (MS, 2013).

Reduzir a letalidade, eliminar a transmissão e evitar a reintrodução em locais já controlados são os principais objetivos na busca pela erradicação da malária. Várias são as estratégias adotadas nessa busca, sendo as mais importantes o diagnóstico precoce e o tratamento oportuno e adequado dos casos, além do controle do mosquito transmissor (MS, 2013). A terapia combinada à base de derivados de artemisina – ACT (do inglês *Artemisinin-based combinatory therapy*) é recomendada pela OMS como tratamento de primeira escolha no tratamento de malária causada por *P. falciparum* desde 2006 (WHO, 2012; , 2013). No Brasil a utilização da ACT também é adotada desde 2006 como estratégia terapêutica, sendo o artesunato (ARS) e artemeter as drogas de escolha no tratamento de infecções por *P. falciparum* (MS, 2010). Como alternativa para melhorar a eficiência do tratamento, acelerar a resposta terapêutica e retardar o desenvolvimento de resistência dos parasitas, esses medicamentos normalmente são utilizados em associações com outras drogas, como a mefloquina (MFQ), amodiaquina e lumefantrina (WILAIRATANA *et al.*, 2002). Atualmente a ACT a base de ARS e MFQ é considerada o tratamento de primeira escolha para malária causada por *P. falciparum*, tendo essa associação a segurança e a eficácia bem estabelecida (AMBLER *et al.*, 2009).

Entretanto, um dos obstáculos ao tratamento, e que nos últimos anos tem contribuído no desenvolvimento da resistência de cepas do *P. falciparum* à quimioterapia, é a incidência do uso de medicamentos falsificados (NEWTON *et al.*,

2008). Os antimaláricos têm sido frequentemente alvo de falsificações, apresentando cópias que vão desde as mais primitivas até as mais sofisticadas, com concentrações de ingredientes ativos em doses subterapêuticas ou até mesmo sem a presença de nenhuma substância ativa (NEWTON *et al.*, 2006). Em 2001, no sudeste da Ásia, um estudo revelou que 38% dos 104 medicamentos, contra a malária, comercializados nas farmácias não continham ingredientes ativos (WHO, 2006b).

Por se tratar de uma doença que ocorre principalmente em regiões tropicais e que nem sempre dispõem de boa infra-estrutura, essas condições extremas de temperatura e umidade favorecem a degradação química dos ativos. Alterações das propriedades biofarmacêuticas dos medicamentos tornam-os ineficientes. O uso de doses subterapêuticas exercem uma pressão seletiva, favorecendo o aparecimento de organismos resistentes aos fármacos devido às infecções tratadas incompletamente (TAYLOR; SHAKOOR; BEHRENS, 1995; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

Garantir a segurança e a eficácia do tratamento aplicado aos pacientes, assegurando que os medicamentos usados não são falsificados nem se encontrem abaixo da concentração terapêutica adequada, é de extrema importância no conjunto das estratégias que podem ser usadas no combate à malária. Nesse contexto, métodos analíticos para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos de interesse nacional devem ser objeto de pesquisa, visando buscar uma independência na produção e controle de qualidade, garantindo um nível sanitário adequado à população.

Apesar da terapia a base de ARS e MFQ ser recomendada pelo Ministério da Saúde na terapêutica da malária desde 2006, a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) não apresenta monografia para essa associação. Compêndios oficializados pela legislação brasileira como a Farmacopéia Americana 36 (2013), Farmacopéia Européia 8 (2014) e Farmacopéia Japonesa XV (2006) tampouco descrevem métodos analíticos para esta associação. A ausência de métodos analíticos para a associação de ARS e MFQ não se limita apenas aos compêndios oficiais. Levantamentos realizados na literatura científica mostram que até o presente momento apenas dois métodos estão descritos para a quantificação simultânea da associação destes fármacos, sendo um por espectrofotometria no ultravioleta (KALYANKAR *et al.*, 2013) e outro por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (NOGUEIRA *et al.*, 2013). No entanto, a espectrofotometria no UV

é uma técnica restrita a substâncias com boa absorvidade no UV, normalmente sendo necessária a presença de bons grupos cromóforos, o que não é o caso do ARS. Também não foi encontrado na literatura nenhum método para determinação simultânea dos fármacos por técnicas de infravermelho médio (IVM) e calibração multivariada ou por CLAE acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM).

A técnica IVM aliada à calibração multivariada apresenta vantagens que se fundamentam no fato de: ser uma técnica que exige menor preparo de amostra, menos tempo de análise, menor uso de solventes, permite uma avaliação confiável e reproduzível. Porém, exige um desenvolvimento mais sofisticado devido ao tratamento estatístico (calibração multivariada). Já a CLAE-EM/EM é capaz de analisar diferentes matrizes, permitindo separar e analisar quantitativamente diversos compostos presentes, com alta resolução, eficiência e seletividade (BLANCO *et al.*, 1998; RIBANI *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2005).

Os fatos apresentados justificam a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos para a associação farmacêutica do ARS e MFQ, tanto por espectroscopia no IVM com calibração multivariada, como por CLAE-EM/EM. Essas técnicas podem vir a serem utilizadas como referência na indústria farmacêutica em áreas que se estendem desde o desenvolvimento de novos produtos ao controle de qualidade e também como referência para laboratórios oficiais no controle e avaliação fiscal. Os métodos aqui desenvolvidos podem servir de base para aplicação em laboratórios ou até como base para desenvolvimento em equipamentos portáteis.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos por espectroscopia no IVM associada à calibração multivariada e também por CLAE-EM/EM, capazes de quantificar simultaneamente a associação dos fármacos ARS e MFQ.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver método por espectroscopia no IVM associado à calibração multivariada para a quantificação simultânea de ARS e MFQ.

- Desenvolver método por CLAE-EM/EM para a quantificação simultânea de ARS e MFQ.

- Validar os métodos desenvolvidos de acordo com as normas vigentes nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO) e internacionais (*International Conference of Harmonization* – ICH; *American Society for Testing and Materials* - ASTM).

- Aplicar o método desenvolvido por IVM associado à calibração multivariada em amostras da associação de ARS e MFQ distribuídas pelo Governo Federal, para o tratamento da malária, e comparar com os resultados obtidos por CLAE-EM/EM estatisticamente através de teste t para amostras independentes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MALÁRIA

#### 2.1.1 Agente etiológico, ciclo biológico, patogenia e sintomas

A malária é uma doença infecciosa causada por algumas espécies de protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidas através da picada de fêmeas contaminadas de mosquitos do gênero *Anopheles* (HARDMAN; LIMBIRD, 2006). As principais espécies de parasitas responsáveis por infectar humanos são *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, sendo o *P. falciparum* o mais comum na maioria das áreas endêmicas, com exceção da Índia e América do Sul, onde o *P. vivax* é o mais comum (TROY; REMINGTON; BERINGER, 2006; MS, 2010; WHO, 2013). O *P. falciparum* é o responsável pelas formas mais graves da doença e pela maioria dos casos fatais (TROY; REMINGTON; BERINGER, 2006; WHO, 2013).

O ciclo de vida dos parasitas da malária é complexo, abrange um ciclo de reprodução sexuado, que ocorre nas fêmeas do mosquito anófeles, e um ciclo assexuado, que ocorre nos seres humanos. Através da picada de um mosquito infectado, formas assexuadas do parasita (esporozoítas) são inoculadas na corrente sanguínea, onde rapidamente migram e alcançam as células parenquimatosas do fígado (hepatócitos). Essa primeira fase da infecção é assintomática e nela ocorre um estágio de transformação, multiplicação e desenvolvimento em esquizontes tissulares, fase que, dependendo da espécie de *Plasmodium* pode durar em média de 5 a 15 dias. O *P. falciparum* tem um período de incubação que varia de 9 a 14 dias, o *P. vivax*, de 12 a 17 dias e o *P. ovale* de 16 a 18 dias. Já o *P. malariae* tem um período de incubação que varia de 18 a 40 dias (BRAGA; FONTES, 2010). Ao final dessa fase, as células parasitadas sofrem ruptura e ocorre a liberação de numerosa quantidade de merozoítas, os quais iniciam um novo ciclo de invasão, multiplicação e desenvolvimento, porém agora nos eritrócitos sanguíneos. Durante o ciclo eritrocitário os merozoítas sofrem outro estágio de multiplicação assexuada e



A infecção caracteriza-se por febre alta e aguda acompanhada de calafrios, cefaleia, vômitos, anorexia, fadiga, diarreia e anemia, sendo que a gravidade da doença depende da espécie infectante, da carga parasitária e das condições imunológicas do hospedeiro, podendo nos casos mais graves levar à morte (RANG *et al.*, 2005; FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008)

A malária *falciparum*, conhecida como malária grave ou maligna ocorre principalmente na África subsaariana; a malária *vivax*, conhecida como malária benigna, é muito comum na América do Sul; a malária *malariae* tem a mesma distribuição geográfica da malária *falciparum*, porém muito menos incidente; e a malária *ovale* ocorre quase que exclusivamente na África (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Os sintomas apresentados pelos pacientes na fase inicial são comuns a muitas outras infecções (cefaleia, cansaço, mal-estar e mialgia), não permitindo um diagnóstico clínico preciso. Após essa fase inicial, de acordo com o tempo de incubação de cada espécie, o paciente passa a apresentar a fase febril de caráter intermitente, conhecido pelo ataque paroxístico agudo, o qual coincide com a ruptura dos eritrócitos. A anemia também é frequente nessas infecções, no entanto é mais intensa nas infecções por *P. falciparum* (BRAGA; FONTES, 2010).

### 2.1.2 Epidemiologia da malária

Mundialmente reconhecida como um grave problema de saúde pública, a malária acomete principalmente países das regiões tropicais do mundo. Segundo a OMS, no ano de 2013, cerca de 3,2 bilhões de pessoas encontrava-se sob o risco de contrair a malária, estimando-se aproximadamente 198 milhões de casos e 584 mil mortes ao redor do mundo. De acordo com o último relatório da OMS, publicado no ano de 2014, 97 países convivem com o risco de transmissão da malária, sendo que desses, 6 são classificados como áreas em fase de prevenção à reintrodução (WHO, 2014).

No Brasil o quadro epidemiológico da malária, embora em declínio, ainda é preocupante. De 2000 a 2011, foram notificados uma média anual de 422.858 casos. Entre 2000 e 2002, houve redução do número de casos notificados, porém, no período de 2002 a 2005, a malária apresentou tendência de aumento até chegar a 607.782 casos por ano em 2005. A partir de 2006 essa tendência mudou, apresentando uma redução média de 56.866 casos a cada ano. No ano de 2011 foram reportados cerca de 265 mil casos. Desses, 98% foram transmitidos na região da Amazônia Legal, sendo *P. vivax* responsável por 87% dos casos (MS, 2013).

### 2.1.3 Tratamento da malária causada por *p. falciparum*

A malária causada por *P. falciparum* teve uma redução expressiva a partir de 2006, reduzindo o número de casos notificados de mais de 20,0% para menos de 12,0%. Essa redução foi atribuída à mudança no tratamento de primeira escolha da malária por essa espécie, adotado a partir de 2006, passando para o esquema terapêutico com combinações de derivados da artemisinina (MS, 2010; OLIVEIRA-FERREIRA *et al.*, 2010).

O complexo ciclo de vida e as diversas formas morfológicas que os parasitas causadores da malária assumem nas diferentes fases do ciclo, tornam o tratamento da malária muitas vezes longo e complicado, por vezes até ineficaz devido à reinfecção do paciente, dificultando a ação dos fármacos. A dificuldade de acesso a medidas sabidamente eficazes no combate à doença, tais como educação da população de risco, uso de quimioterapia eficiente e controle do vetor fazem com que em áreas endêmicas haja reincidência na infecção ao longo do tratamento, dificultando a erradicação do parasita (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). O diagnóstico precoce e o rápido início do tratamento com antimaláricos adequados, por período correto são os meios mais adequados no combate da malária, reduzindo a gravidade e a letalidade (MS, 2010).

O tratamento da malária fundamenta-se em impedir o desenvolvimento do ciclo evolutivo do parasita. Para alcançar esse objetivo, diversos fármacos com diferentes mecanismos de ação devem ser utilizados. Os principais mecanismos de



ação baseiam-se na interrupção da esquizogônia sanguínea ou ciclo eritrocitário, responsável pela patogenia e manifestações clínicas; destruição das formas latentes do parasita no ciclo tecidual (hepatócitos), evitando assim recaídas tardias; e interrupção da transmissão dos parasitas, pelo uso de fármacos que impedem o desenvolvimento de formas sexuadas (gametócitos) (WILAIRATANA *et al.*, 2002; MS, 2010).

A ACT é recomendada pela OMS como tratamento de primeira escolha no tratamento de malária por *P. falciparum* desde 2002 (WHO, 2012; , 2013). No Brasil a utilização da ACT é adotada desde 2006, sendo o ARS e artemeter os fármacos de escolha no tratamento de infecções por *P. falciparum* (MS, 2010). As vantagens da ACT estão relacionadas com o modo de ação dos derivados da artemisinina, tais como: diminuição rápida dos sintomas clínicos pela rápida redução da carga parasitária; efeito terapêutico frente a cepas de *P. falciparum* multi-resistentes; ação sobre formação dos gametócitos, reduzindo a transmissão de cepas resistentes; poucas evidências de reações adversas (WHO, 2006a).

Como alternativa para melhorar a eficiência do tratamento, acelerar a resposta terapêutica e retardar o desenvolvimento de resistência pelos parasitas, esses medicamentos normalmente são utilizados em associações com outros fármacos, como a MFQ, amodiaquina e lumefantrina (WILAIRATANA *et al.*, 2002). O uso de terapia combinada com drogas que possuem diferentes mecanismos de ação frequentemente aumenta a eficácia do tratamento e dificulta o aparecimento de cepas resistentes em curto prazo (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Atualmente a ACT, a base de ARS e MFQ, é considerada o tratamento de primeira escolha para malária por *P. falciparum*, tendo essa associação a segurança e a eficácia bem estabelecida (AMBLER *et al.*, 2009).

#### 2.1.4 Resistência ao tratamento com antimaláricos

Um dos grandes obstáculos no combate da malária nos dias de hoje é a resistência que os parasitas têm desenvolvido em relação ao arsenal farmacoterapêutico. A capacidade de adaptação dos parasitas, principalmente o *P.*

*falciparum*, evidencia-se na rapidez com que se desenvolveu resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940 (SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Acredita-se que ocorrência de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina ocorreu inicialmente no final dos anos 50, no Sudeste Asiático e também na América do Sul. Na região subsaariana as primeiras documentações de parasitas resistentes à cloroquina foram em 1978, no Quênia e na Tanzânia. Desde então cepas com esta característica se espalharam por todas as áreas endêmicas do mundo e uma diminuição da sensibilidade a quinina e a MFQ tem sido relatada na América do Sul (GUERIN *et al.*, 2002).

Vários fatores contribuem para o surgimento de resistência: a pressão dos fármacos devido ao uso excessivo dos antimaláricos; o uso inadequado e automedicação; a administração de fármacos com baixa qualidade; e ausência de uma vacina para controlar a doença (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Recentemente, a OMS recomendou a descontinuação do uso dos derivados da artemisinina como monoterapia em todos os países, devido ao surgimento e disseminação de resistência aos medicamentos. Apesar disso, aborgagem ainda é utilizada em muitos países (WHO, 2012).

## 2.2 ANTIMALÁRICOS

### 2.2.1 Artemisinina e seu derivado artesunato

A artemisinina é um produto natural obtido através da extração de uma erva medicinal chinesa conhecida como *Artemisia annua* (KLAYMAN, 1985). A produção da artemisinina ocorre nas folhas, com acúmulo nas inflorescências, e devido a pequena quantidade de artemisinina extraída da planta (concentrações que variam de 0,01 a 0,8% do peso seco), a produção em larga escala tem uma grande limitação, contribuindo para o alto custo da medicação (ABDIN *et al.*, 2003). Como

alternativa, vários análogos semi-sintéticos da artemisinina foram produzidos para o tratamento da malária, buscando-se melhores propriedades como potência e biodisponibilidade. Os derivados dihidroartemisinina, ARS (FIGURA 2) e artemeter formam o grupo mais importante de medicamentos antimaláricos da atualidade. Estes compostos também são sesquiterpenos e apresentam uma ponte endoperóxido sobre o anel de 7 membros, possuem rápida e potente atividade esquizotocida sanguínea, com atividade na fase eritrocitária, e também possuem atividade gametocida, limitando a transmissão para outros hospedeiros e reduzindo assim o espalhamento de formas resistentes (HYDE, 2002; KRISHNA; UHLEMANN; HAYNES, 2004). Vários estudos mostram que a ponte endoperóxido destes compostos pode ser clivada pela redução com íon ferroso presente no grupo heme ingerido pelo parasita. Esta clivagem forma um radical de carbono que pode alquilar e danificar proteínas do parasita (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

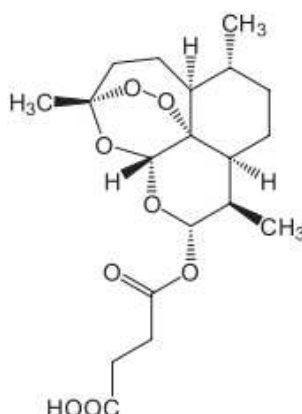


FIGURA 2 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ARTESUNATO.  
FONTE: The Merck Index (WILLIAMS, 2013).

O ARS é um sal derivado da artemisinina na forma de éster hemissuccinato hidrossolúvel, porém com baixa estabilidade em solução aquosa com pH neutro ou ácido (HARDMAN; LIMBIRD, 2006; WHO, 2010). O ARS, ao contrário dos demais derivados da artemisinina, é eficaz quando administrado por via oral, retal, intramuscular e intravenosa, sendo rapidamente e quase que inteiramente convertido no metabólito ativo dihidroartemisinina. Grande parte da hidrólise do ARS é pré-sistêmica, e o efeito antimalárico resulta primariamente da dihidroartemisinina que é retirada do plasma com uma meia-vida de aproximadamente 45 minutos (CLARK, 2009; WHO, 2010).

O ARS pode reduzir a febre em pacientes com malária falciparum após 14 a 38 horas da administração, com tempo médio de 18 horas e eliminar a carga parasitária em tempo médio de 38 horas (17 a 68 horas). Seu uso oral é normalmente recomendado para malária falciparum não complicada, em áreas onde há evidências de resistência a outras drogas, sendo sempre administrado junto com MFQ na dose terapêutica (HIEN; WHITE, 1993). O uso parenteral é realizado apenas para o tratamento de malária falciparum severa em regiões onde há evidências de resistência a quinina (WHO, 2010).

Devido ao tempo de meia vida muito curto do ARS, sua utilização como monoterapia exige um regime de dose múltipla durante sete dias, o que torna o tratamento mais demorado e de difícil adesão. O uso do ARS em associação com outro pode retardar o desenvolvimento de resistência à MFQ. A estratégia terapêutica consiste em administrar ARS para reduzir rapidamente a biomassa infecciosa, seguida de MFQ para erradicar a infecção (PRICE *et al.*, 1999).

### 2.2.2 Mefloquina

A MFQ (FIGURA 3) é um composto esquizotônico da classe dos metanóis 4-quinolínicos, exibe atividade contra o *P. falciparum* e *P. vivax*. A ação antiparasitária está associada à inibição da heme polimerase (RANG *et al.*, 2005).

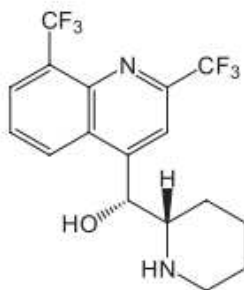


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MEFLOQUINA.  
FONTE: The Merck Index (WILLIAMS, 2013).

Existe como mistura racêmica de quatro isômeros ópticos com potência antimalárica aproximadamente igual. Surgiu como um medicamento altamente

seguro e eficaz contra cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina. É um potente esquizotocida sanguíneo, não tendo ação contra os estágios hepáticos iniciais e gametócitos maduros de *P. falciparum* e nem contra as formas latentes do *P. vivax* (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

A primeira utilização da MFQ foi para tratar a malária por *P. falciparum* resistente à cloroquina, na Tailândia, sendo formulada com pirimetamina-sulfadoxina, para retardar o desenvolvimento de parasitas resistentes. Essa estratégia falhou completamente, pois devido a lenta eliminação da MFQ, as concentrações subterapêuticas do fármaco estimularam a seleção de parasitas resistentes (HARDMAN; LIMBIRD, 2006).

Atualmente a MFQ é recomendada em associação com derivados da artemisinina, para a profilaxia e quimioterapia da malária causada por *P. falciparum*. A MFQ é razoavelmente bem absorvida pelo trato gastrointestinal, porém apresenta variação inter individual em relação ao tempo necessário para alcançar o pico de concentração plasmática. Tem alta capacidade de ligação a proteínas (98% em plasma) e é largamente distribuída através do corpo. Sua meia vida de eliminação é longa, com uma média de 21 dias em adultos, porém tendendo a ser mais curta em crianças e gestantes. Devido a meia vida de eliminação longa, o seu uso em áreas endêmicas deve ser bastante cauteloso, pois pode ocorrer reinfecção do paciente com níveis subterapêuticos de MFQ, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes à droga (WHO, 2010).

## 2.3 QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS USADOS NO TRATAMENTO DA MALÁRIA

Problemas com falsificações e de baixa qualidade dos medicamentos não é uma realidade que se observa apenas a uma determinada classe terapêutica ou a uma região localizada do globo. Tais problemas ocorrem em todos os âmbitos e têm se tornado um grave problema de saúde pública. No caso da malária, reduzir a letalidade, eliminar a transmissão e evitar a reintrodução em locais já controlados são os principais objetivos na busca pela erradicação. Várias são as estratégias utilizadas, as mais importantes são: diagnóstico precoce; tratamento oportuno e

adequado dos casos; além do controle do mosquito transmissor (MS, 2013). No entanto, a incidência do uso de medicamentos de baixa qualidade ou falsificados, tem se mostrado como um grande obstáculo e nos últimos anos tem contribuído negativamente no combate da malária, ao corroborar com o surgimento de cepas resistentes do *P. falciparum* à quimioterapia (NEWTON *et al.*, 2008).

Os antimaláricos têm sido frequentemente alvo de falsificações, que vão desde as mais primitivas até as mais sofisticadas, com concentrações de ingredientes ativos em quantidades subterapêuticas ou até mesmo isentas destes (NEWTON *et al.*, 2006). De acordo com a OMS, as falsificações têm ocorrido tanto em produtos de referência quanto em genéricos. Em 2001, no sudeste da Ásia, um estudo revelou que 38% dos 104 medicamentos contra a malária, comercializados nas farmácias, não continham ingredientes ativos (WHO, 2006b).

Por se tratar de uma doença que ocorre principalmente em regiões tropicais e de pouca infraestrutura, a estabilidade química dos medicamentos sob essas condições é outro fator importante a ser considerado. Nessas condições a degradação química é acelerada, alterando propriedades biofarmacêuticas dos medicamentos e os tornando ineficientes devido ao decaimento nos teores de fármacos ativos. O uso de doses subterapêuticas de antimaláricos pode exercer uma pressão seletiva levando a organismos resistentes aos fármacos (TAYLOR; SHAKOOR; BEHRENS, 1995; NOGUEIRA *et al.*, 2011).

## 2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE ARS E MFQ EM ASSOCIAÇÃO

Até o presente momento apenas dois métodos foram encontrados na literatura para a quantificação simultânea da associação dos fármacos ARS e MFQ. Kalyankar e colaboradores (2013) descrevem um método por espectrofotometria no UV para a determinação simultânea de ARS em combinação com a MFQ. Os comprimentos de onda utilizados foram 240 e 222 nm, para a determinação de ARS e MFQ, respectivamente, sendo o método validado de acordo com as normas do ICH. Segundo os autores o método é adequado para análise isolada das matérias-primas ARS e MFQ ou da associação dos fármacos em formulações farmacêuticas,

desde que sem a interferência de excipientes. Além dessa, outra limitação se refere ao fato do ARS não possuir bons grupos cromóforos.

Também no ano de 2013 foi descrito um método por CLAE acoplado a detector de arranjos de diodo (DAD) para a determinação simultânea de ARS e MFQ (NOGUEIRA *et al.*, 2013). No entanto, devido à ausência de bons grupos cromóforos, o comprimento de onda escolhido para sua detecção e quantificação foi 210 nm.

Outros métodos também estão descritos para a quantificação ou caracterização dos fármacos ARS e MFQ, porém, isoladamente ou em associação com outros fármacos que não a associação de interesse deste trabalho. No QUADRO 1 são apresentados os métodos descritos que utilizam a técnica de espectrometria de massa ou infravermelho, que são as técnicas de interesse do presente trabalho.

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica e Finalidade</b>	<b>Referência</b>
Artesunato e Azitromicina	Cápsula	IVP - calibração multivariada (quantificação)	Boyer, 2012
Artesunato	Comprimido	IVP - calibração multivariada (caracterização)	Dowell, 2008
Artesunato, Artemeter e Diidroartemisina	Plasma de carneiro	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> ) (quantificação)	Duthaler, 2010
Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano e de cachorro	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> ) (quantificação)	Gu, 2008
Artesunato, Diidroartemisina e 10-hidroxi-praziquantel	Plasma de rato	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>Q-trap</i> ) (quantificação)	Guanghzao, 2013
Artesunato	Comprimido	CLAE-ESI-EM ( <i>TOF</i> ) (caracterização)	Hall, 2006
Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> ) (quantificação)	Hanpithakponga, 2008
Quinina, Cloroquina e Artesunato	Comprimido	EM (caracterização)	Harris, 2012

QUADRO 1 – MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA A DETERMINAÇÃO DE ARTESUNATO E/OU MEFLOQUINA POR TÉCNICAS DE INFRAVERMELHO OU ESPECTROMETRIA DE MASSA (**continua**)

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica e Finalidade</b>	<b>Referência</b>
Artesunato Mefloquina Quinino Sulfadoxina	Plasma humano	CLAE-EM/EM (quantificação)	Hodel, 2009
Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano	CLAE-ESI-EM ( <i>quadrupolo</i> ) (quantificação)	Kyeong, 2010
Artesunato e Artemisinina	Comprimido	FTIR (caracterização)	Lawal, 2012
Artesunato	Comprimido	CLAE-APCI-EM ( <i>ion trap</i> ) (quantificação)	Lindegardh, 2007
Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> ) (quantificação)	Lindegardh, 2008
Artemisinina	Plasma humano	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> )	Lindegardh, 2009
Artemisinina, Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano	CLAE-ESI-EM/EM ( <i>triplo-quadrupolo</i> ) (quantificação)	Lindegardh, 2011
Artesunato e Diidroartemisina	Plasma humano	CLAE-APCI-EM (quantificação)	Naik, 2005
Artesunato	Comprimido	CLAE-DESI-EM ( <i>ion trap</i> ) (caracterização)	Nyadong, 2007
Artesunato	Comprimido	CLAE-DESI-EM ( <i>ion trap</i> ) (quantificação)	Nyadong, 2008
Artesunato	Comprimido	FTIR e espectroscopia RAMAN (caracterização)	Ricci, 2007
Artesunato e Dihidroartemisina	Plasma humano	CLAE-EM (quantificação)	Teja-Isavadham, 2010

**QUADRO 1 – MÉTODOS DESCRITOS NA LITERATURA PARA A DETERMINAÇÃO DE ARTESUNATO E/OU MEFLOQUINA POR TÉCNICAS DE INFRAVERMELHO OU ESPECTROMETRIA DE MASSA (conclusão)**

FONTE: O autor (2015).

NOTA: CLAE-APCI-EM, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização química à pressão atmosférica; CLAE-DESI-EM, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização *electrospray* por dessorção; CLAE-EM/EM, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial; CLAE-ESI-EM, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas utilizando fonte de ionização *electrospray*; CLAE-ESI-EM/EM, Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial e fonte de ionização *electrospray*; EM, Espectrometria de massas; FTIR, Infravermelho por transformada de Fourier; IVP, Espectroscopia no infravermelho próximo. *Q-trap*, Espectroscopia de massa híbrida de quadrupolo com armadilha de íons; TOF, tempo de voo.



## 2.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROSCOPIA DE MASSA SEQUENCIAL (CLAE-EM/EM)

A cromatografia líquida é uma técnica analítica muito difundida e empregada em diversas áreas. Teve início nos anos 50 e desde então tem evoluído consideravelmente. Na última década foi quando a técnica mais evoluiu, na qual se desenvolveram colunas de alta eficiência, compostas por pequenas partículas, permitindo análises mais rápidas (MALDANER; JARDIM, 2009).

Essa técnica é capaz de analisar diferentes matrizes, permitindo separar e analisar quantitativamente diversos compostos presentes, com alta resolução, eficiência e seletividade. Na CLAE, a fase móvel é eluída através de uma coluna recheada pela fase estacionária sob altas pressões, e a separação dos componentes da matriz é realizada através da interação diferencial entre os componentes da matriz por essas duas fases. Basicamente o equipamento é composto por uma bomba, sistema de injeção de amostra, forno para coluna, sistema de detecção, coluna e fase móvel. Os detectores medem a concentração ou a massa dos analitos presentes na amostra que estão deixando a coluna. Dentre os detectores mais comumente utilizados estão o arranjo de diodos, fluorescência, espalhamento de luz, eletroquímicos e espectrômetro de massas (RIBANI *et al.*, 2004).

A combinação da cromatografia líquida e a espectrometria de massas sequencial é uma técnica analítica que ganhou extrema importância em diversos segmentos, principalmente no setor farmacêutico e alimentício. Essa técnica associa a eficiência de separação da cromatografia com a sensibilidade e especificidade da espectrometria de massas, tornando-se uma importante ferramenta na área farmacêutica (PEREIRA *et al.*, 2005).

A espectrometria de massas mede a razão massa/carga ( $m/z$ ) de um átomo ou molécula ionizada positiva ou negativamente. A intensidade ou abundância dos íons é característica de cada molécula e está relacionada com a quantidade de analito presente na amostra. Assim, os espectros de massas do íon precursor e de seus fragmentos servem tanto para identificação quanto quantificação da amostra (DOOLEY, 2003).

O espectrômetro de massas é composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector, sendo que diferentes tipos desses componentes têm sido desenvolvidos e utilizados em análises das mais variadas. Independente da técnica a ser aplicada, na espectrometria de massa é necessário que a amostra seja ionizada para a sua detecção (GLISH; VACHET, 2003). As principais fontes de ionização que permitem interface com a CLAE são a ionização química à pressão atmosférica (APCI) e a ionização por *electrospray* (ESI), sendo, ambas, formas de ionização a pressão atmosférica (API) (KORFMACHER, 2005).

A API é uma técnica que permite a ionização sem o uso de vácuo, permitindo análise de espécies não-voláteis, carregadas e instáveis. A ESI é uma das formas de API na qual a amostra é pulverizada através de um capilar altamente carregado. As gotículas carregadas, oriundas do *spray*, devido à repulsão, se fragmentam e evaporam revelando os íons livres e solvatados em uma nuvem, que é direcionada para entrar no espectrômetro de massas. Se o capilar está carregado positivamente formará íons com carga positiva, representando muitas vezes a espécie protonada. A situação oposta ocorre quando o capilar está carregado negativamente. Os íons formados terão carga negativa, na sua forma desprotonada. A ESI é uma técnica sensível, robusta e fácil, sendo amplamente utilizada. Esse tipo de fonte é um processo de ionização brando, ou seja, uma mínima energia é transferida para os analitos, permitindo que esses continuem intactos durante a ionização (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

A ampla faixa de aplicação é uma grande vantagem dessa técnica, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa de diversos compostos, altamente polares ou facilmente ionizáveis em solução, atingindo desde simples moléculas inorgânicas termolábeis e não voláteis até complexas moléculas biológicas. Também trabalha muito bem com proporções de água e solvente orgânico, sendo adequado, portanto, para hifenação com CLAE. Uma desvantagem é a susceptibilidade a supressão iônica quando em presença de altas concentrações de sal (GLISH; VACHET, 2003; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Assim como as fontes de ionização, existem diferentes tipos de analisadores de massa, os quais têm como objetivo separar os íons de acordo com sua razão massa carga ( $m/z$ ) e transmiti-los ao detector. A escolha do tipo de analisador a ser utilizado em determinada análise depende do limite de detecção (LD), do intervalo de massas e da resolução desejados (VAN BRAMER, 1997). Os principais

analisadores de massa podem ser divididos em dois grupos: os analisadores de transmissão e os de captura. Nos analisadores de transmissão, é através de um campo eletromagnético que os íons são conduzidos até o detector, nesse grupo encontram-se os analisadores de tempo de voo (TOF), de setor e quadrupolo. Nos analisadores de captura, os íons são armazenados por um campo eletromagnético até serem liberados para o detector. Nesse grupo encontram-se os analisadores *íon trap* e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier (GLISH; VACHET, 2003).

O quadrupolo é um exemplo de analisador de transmissão. Ao longo dos anos, o quadrupolo foi o analisador mais amplamente utilizado, sendo acoplado principalmente a cromatografia gasosa e líquida. A separação de massa em um quadrupolo é o resultado da movimentação do íon num campo elétrico dinâmico (rádio frequência) que é dependente diretamente da  $m/z$  dos íons (GLISH; VACHET, 2003).

O analisador triplo quadrupolo (EM/EM), também conhecido como EM seqüencial ou EM *Tandem*, é o mais utilizado para doseamentos analíticos. É constituído por três quadrupolos em sequência, onde o primeiro e o terceiro são utilizados como selecionadores de massas e o segundo quadrupolo é utilizado como cela de colisão onde a fragmentação dos íons pode ser controlada por voltagem e densidade de gás de colisão. O analisador é composto basicamente por quatro barras cilíndricas paralelas. Um campo elétrico acelera os íons que estão na fonte de ionização para dentro dos quadrupolos. Então, é aplicada aos eletrodos uma determinada rádio frequência (RF) e uma corrente de voltagem (DC) gerando uma oscilação no campo elétrico que atua como um filtro, permitindo a transmissão até o detector apenas da  $m/z$  selecionada (VAN BRAMER, 1997; DOOLEY, 2003).

## 2.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO

Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. De acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida, pode-se classificar as técnicas empregadas como

espectroscopia de raio  $\gamma$ , raio X, UV, visível, infravermelho, micro-ondas e rádio frequência (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A região do infravermelho corresponde à parte do espectro eletromagnético com comprimento de onda maior que o da região do visível e menor que o da micro-ondas – 780 nm a 100.000 nm (números de onda de aproximadamente 12800 a 10  $\text{cm}^{-1}$ ). Do ponto de vista de aplicação e instrumentação, esta região é subdividida em outras três regiões, que são conhecidas como infravermelho próximo (12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), IVM (4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ) e infravermelho distante (400 a 10  $\text{cm}^{-1}$ ) (STUART, 2004; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A região do IVM vai de aproximadamente 4000 a 670  $\text{cm}^{-1}$ , e provavelmente é a mais utilizada na indústria farmacêutica para a identificação de compostos. Ainda hoje, a maioria dessas aplicações consiste na identificação de compostos orgânicos, pois por se tratar de uma região que corresponde às variações de energia vibracional das moléculas, pequenas diferenças na estrutura e constituição resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção, produzindo espectros com evidências da identidade dos compostos (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A radiação no infravermelho geralmente não possui energia suficiente para promover transições eletrônicas, ao contrário da radiação UV e visível. Porém a absorção deste tipo de radiação pode induzir transições nos estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental da molécula (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas estão no estado fundamental de energia vibracional, ou seja, átomos ou grupos de átomos que participam de ligações são deslocados uns em relação aos outros em frequências definidas pela força da ligação e massa individual de cada átomo ou grupo de átomos. A amplitude dessas vibrações é da ordem de alguns nanômetros e aumenta se alguma energia é transferida à molécula, ou seja, produz excitação a um nível de energia de vibração mais elevado (PASQUINI, 2003). Ao absorver a radiação infravermelha, a molécula converte esta energia em vibração molecular, esse processo é quantizado e gera um espectro vibracional que costuma aparecer como bandas. No entanto, para uma vibração ser ativa é necessário que haja interação da radiação infravermelha com a vibração de uma molécula, e ocorrerá apenas se o vetor do campo eletromagnético da radiação oscilar na mesma frequência do momento dipolar da molécula (SCHARDER, 1995).

As vibrações moleculares podem ser deformações axiais e angulares. Uma vibração de deformação axial ou estiramento é traduzida por um movimento rítmico ao longo do eixo da ligação em que a distância entre os átomos aumenta e diminui. As vibrações de deformação angular correspondem a variações ritmadas das ligações que têm um átomo em comum ou o movimento de um grupo de átomos em relação ao resto da molécula sem que as posições relativas dos átomos do grupo se alterem. As vibrações de deformação angular envolvem alterações dos ângulos de ligação em relação a um conjunto de coordenadas arbitrário da molécula (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

A espectroscopia de absorção no infravermelho é uma técnica reconhecida pelo baixo custo de instrumentação, rapidez, sensibilidade nas análises, possibilidade de medidas não destrutivas e passíveis de serem realizadas em tempo real. Além disso, não há a necessidade de utilizar solventes orgânicos, não gerando resíduos e assim, pode ser chamada de sustentável. Outro grande atrativo da técnica é a menor manipulação ou pré-tratamento da amostra em análise, o que proporciona resultados exatos (PASQUINI, 2003; LIMA *et al.*, 2009; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013).

Basicamente existem dois tipos de instrumentos de infravermelho: os que trabalham com uma técnica dispersiva e empregam um prisma, e os por transformada de Fourier (FT). Os instrumentos por técnicas dispersivas são usados desde 1940, porém atualmente os espectrômetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são os mais utilizados, pois proporcionam um espectro de melhor qualidade e que é adquirido mais rapidamente (STUART, 2004). O FTIR coleta simultaneamente os dados em todas as frequências do espectro do infravermelho, e isto só é possível devido ao interferômetro de Michelson, que converte a radiação multi-frequência, que é constante com o tempo, em um interferograma que é dado não em função da frequência, mas do tempo. Posteriormente, através do processo matemático de transformação de Fourier, o interferograma é convertido em um espectro (HESSE; MEIER; ZEEH, 2008).

Os espectros de infravermelho podem ser adquiridos por meio de métodos de transmissão ou por métodos de refletância. Os métodos de transmissão baseiam-se na absorção da radiação infravermelha, em números de onda específicos, enquanto passam pela amostra. Por técnicas de dispersão é possível analisar amostras líquidas, gasosas ou sólidas. Os métodos de refletância podem ser usados

em amostras que são de difícil análise por métodos de transmissão, classificam-se em duas categorias: Reflexão interna como a refletância total atenuada, ou por reflexão externa que pode ser especular ou difusa (STUART, 2004).

A espectrometria de reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier ou DRIFTS (do inglês, *diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy*) é um modo efetivo de se obter espectros na região do infravermelho, diretamente na amostra, com o mínimo ou sem nenhum pré-tratamento. Essa técnica proporciona uma grande redução no tempo de análise e o mínimo de erros inerentes à intervenção humana (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). A DRIFTS consiste na reflexão da radiação incidente sobre as partículas da superfície da amostra de forma difusa, ou seja, uma vez que a superfície da amostra é irregular a reflexão ocorre em múltiplas direções e de forma aleatória. Após a incidência da radiação no infravermelho, a radiação dispersada é coletada por um ou mais espelhos que concentram e direcionam ao detector. A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, o substrato pode ser contínuo ou fragmentado (na forma de pó), sendo esta técnica adequada para a análise de medicamentos sólidos passíveis de pulverização. Neste processo de reflexão, o feixe de luz incide na amostra, interagindo com a matriz, retornando à superfície da mesma, após absorção parcial e múltiplos espalhamento, FIGURA 4 (PARISOTTO *et al.*, 2009).

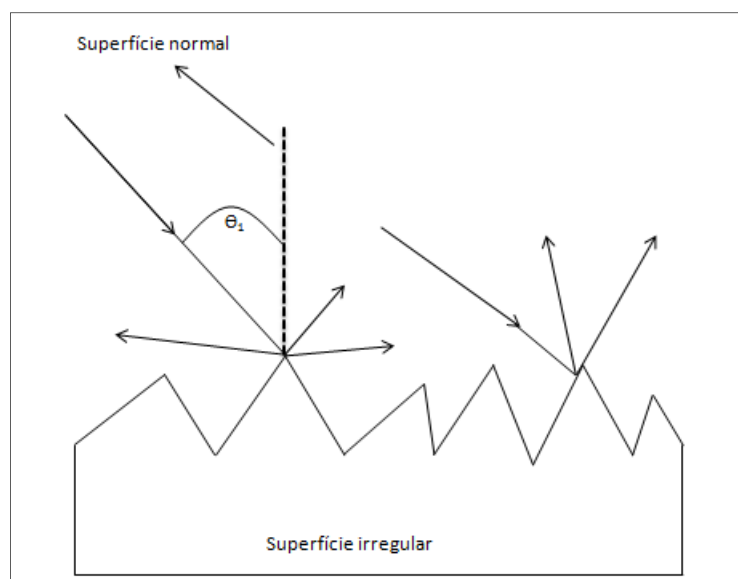


FIGURA 4 - REFLETÂNCIA DIFUSA EM UMA AMOSTRA DE SUPERFÍCIE IRREGULAR

FONTE: Adaptado de SMITH (2011).

A DRIFTS tem se tornado uma ferramenta muito útil nas rotinas de controle de qualidade de ingredientes farmacêuticos em função de características como baixo custo, rapidez e mínimo preparo de amostras (KIPOUROS *et al.*, 2005). No entanto a complexidade de sinal e baixa seletividade impedem o desenvolvimento de métodos de quantificação fundamentados em procedimentos univariados, ou seja, uma relação direta entre a intensidade de absorção de um sinal no espectro com a concentração do analito (SARRAGUÇA; LOPES, 2009). Em amostras complexas ocorre sobreposição intensa de bandas de sinais (fármacos e excipientes), essa sobreposição faz com que a determinação direta seja quase impossível. Como forma de contornar essa situação, ferramentas quimiométricas são cada vez mais utilizadas, como forma de permitir a utilização da informação espectral relevante para a obtenção de dados quantitativos (PÖLLANEN *et al.*, 2005).

## 2.7 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como a área da química que utiliza a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e lógica formal para o tratamento de dados químicos, para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas ou experimentos e extrair o máximo de informações possíveis (BRUNS; FAIGLE, 1985).

No caso de situações onde a determinação de um analito é dificultada ou impedida devido à presença de interferentes, o uso da calibração multivariada permite a modelagem desses interferentes junto com o analito de interesse, ao invés de eliminar os interferentes (separação cromatográfica, extração, etc.). A ideia central consiste em substituir a separação física das espécies pela separação quimiométrica de seus sinais. As vantagens potenciais da determinação direta são maior rapidez, menor custo e simplificação ao máximo das etapas de tratamento da amostra, diminuindo as possibilidades de erro causadas pela sua manipulação (SENA, 2004).

Conforme o objetivo do estudo, a quimiometria pode ser dividida em subáreas muito aplicadas atualmente no Brasil, entre elas pode-se destacar o planejamento e otimização de experimentos, o reconhecimento de padrões

(métodos de análise exploratória e classificação) e a calibração multivariada (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

### 2.7.1 Calibração multivariada

A calibração também pode ser definida como o processo em que se estabelece uma relação entre a resposta instrumental (sinal analítico) e uma determinada propriedade da amostra (por exemplo, a concentração do analito). A equação matemática que descreve esta relação é denominada modelo de calibração e a representação gráfica é denominada comumente de curva de calibração (NUNES, 2008). A maioria das técnicas para a determinação de fármacos é baseada em técnicas cromatográficas e determinações univariadas. No entanto, e apesar de serem bem estabelecidas e reconhecidas pelos órgãos reguladores, elas apresentam desvantagens de custo e tempo de análise relativamente alto (SENA *et al.*, 2007).

A calibração multivariada tornou-se uma ferramenta analítica importante em diferentes campos de aplicação, especialmente nas análises de alimentos, farmacêutica, agricultura, ambiental e química industrial. É aplicada tanto para a determinação de espécies químicas quanto físicas e uma das razões de grande interesse é que o procedimento analítico é rápido e eficiente na abordagem de muitos problemas. Isso faz com que modelos de calibração multivariada sejam uma alternativa quando métodos univariados não podem ser aplicados (FORINA; LANTERI; CASALE, 2007).

#### 2.7.1.1 PLS

O método de calibração multivariada mais amplamente utilizado em quimiometria é a regressão por mínimos quadrados parciais - PLS (do inglês *partial least squares*). Este método permite estabelecer um modelo de regressão linear



entre os dados de uma matriz  $X$  (por exemplo, dados espectrais no instrumento) e os dados de uma matriz  $Y$  (por exemplo, concentração da amostra). Na construção do modelo de calibração com regressão por PLS os dados são dispostos de forma que a matriz  $X$  contenha os dados variáveis independentes e a matriz  $Y$  contenha os dados dependentes, FIGURA 5 (FERREIRA *et al.*, 1999; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007; SENA *et al.*, 2007). Os dados instrumentais medidos são organizados na matriz de variáveis independentes (matriz  $X$ ), apresentando uma amostra em cada linha e as respostas instrumentais medidas em cada coluna. Na matriz de variáveis dependentes (matriz  $Y$ ), os dados de concentração do analito de interesse são inseridos, sendo que cada linha corresponde à uma amostra (correspondente à matriz  $X$ ) e cada coluna corresponde à concentração do analito em pesquisa (FERREIRA *et al.*, 1999; SENA *et al.*, 2007).

$$(a) \quad X = \begin{bmatrix} X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1m} \\ X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2m} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{nm} \end{bmatrix} \quad (b) \quad Y = \begin{bmatrix} X_{11} \\ X_{21} \\ \vdots \\ X_{n1} \end{bmatrix}$$

FIGURA 5 – (a) MATRIZ DE VARIÁVEIS INDEPENDENTES, POR EXEMPLO DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS; (b) MATRIZ DE VARIÁVEIS DEPENDENTES, POR EXEMPLO DADOS DE CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA  
FONTE: FERREIRA *et al.*, 1999.

Essas duas matrizes podem ser decompostas em uma soma de produtos de dois vetores, os *scores* e os *loadings*. Os *scores* representam a projeção dos valores das amostras no espaço enquanto os *loadings* são a expressão da ponderação (“peso”) do conjunto das respostas, conhecidos como variáveis latentes (VLs). Pela decomposição da matriz  $X$  obtém a seguinte equação (equação 1):

$$X = TP_T + E = \sum t_A p_{TA} + E \quad (1)$$

Onde  $T$  é a matriz de *scores* para a matriz  $X$ ,  $P$  é a matriz de *loadings* para a decomposição de  $X$  e  $E$  é a matriz de resíduos.  $A$  subscrito é a soma das VLs em que as matrizes  $X$  e  $Y$  podem ser decompostas.

A matriz  $Y$  contendo as variáveis dependentes é simultaneamente decomposta, de acordo com a equação (2):

$$Y = TQ_T + F = \sum t_A q_{TA} + E \quad (2)$$

Onde  $T$  é a matriz de *scores* para a matriz  $Y$ ,  $Q$  é a matriz de *loadings* para a decomposição de  $Y$ ,  $F$  é a matriz de resíduos.  $A$  subscrito é a soma das VLs em que as matrizes  $X$  e  $Y$  podem ser decompostas.

O produto de  $T$  e  $Pt$  é uma aproximação das variáveis independentes (dados espectrais) e o produto de  $T$  e  $Q^T$  é uma aproximação das variáveis dependentes (concentrações) (SENA, 2004; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007).

Uma importante característica do PLS é a possibilidade de obter escores que estão simultaneamente relacionados às duas matrizes (variáveis independentes  $X$  e variáveis dependentes  $Y$ ). Após estabelecido o número de variáveis latentes e o modelo, a concentração das amostras pode ser estimada a partir dos novos *scores*,  $T$ , e *loadings* do modelo de calibração,  $Q$ , de acordo com a equação (3) (SENA, 2004; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007).

$$Y_n = TQ^T \quad (3)$$

Situações em que na matriz  $Y$  dois ou mais componentes (altamente relacionados) são utilizados, buscando-se a quantificação de dois ou mais componentes, chama-se o método de PLS2. Da mesma forma, quando a matriz  $Y$  é composta por apenas um componente de interesse, esse modelo é chamado PLS1 (BRERETON, 2000; SENA *et al.*, 2004). Ao se utilizar os mesmos dados experimentais com diferentes modelos (PLS1 e PLS2) verificam-se diferenças na previsão das concentrações estimadas para os analitos em estudo, o que demonstra a influência da concentração nesse tipo de modelamento. Em alguns casos, a estimativa da concentração no PLS2 é pior do que aquela estimada por PLS1. Entretanto, PLS2 fornece informações úteis, como a faixa espectral que pode ser mais significativa e quais concentrações podem ser determinadas com maior grau de confiança. Dessa forma, utilizar PLS2 para montar um modelo multivariado inicial pode ser uma boa estratégia para, posteriormente, montar modelos utilizando PLS1 que forneçam melhores resultados de previsão (PASQUINI, 2003).

A capacidade preditiva de modelos de regressão PLS pode ser otimizada através da seleção e uso de faixas espectrais, nos casos em que regiões específicas do espectro são melhores do que o espectro completo. Para essa finalidade utiliza-

se um algoritmo desenvolvido exatamente para este fim, chamado de iPLS (*interval partial least squares*). O princípio desse algoritmo é dividir o espectro em regiões menores, equidistantes e desenvolver modelos para cada subintervalo. Depois disso, a raiz quadrada do erro médio de calibração por validação cruzada (RMSECV) dos subintervalos é comparada com os valores de RMSECV do espectro total (SILVA *et al.*, 2009). Dessa forma localiza-se conjuntos de variáveis que podem resultar nos melhores modelos, eliminando informações não relevantes como bandas que não contenham nenhuma informação das espécies ou propriedades a serem analisadas, além de eliminar parte dos ruídos do sistema. Esta técnica auxilia significativamente na seleção das regiões que estão mais bem correlacionadas com os fármacos, eliminando regiões que apresentam pouca ou duvidosa informação, já que a mistura de excipientes é desconhecida, e desta forma aumenta-se a robustez do modelo. Esse algoritmo seleciona uma faixa do espectro e nos casos em que mais de uma faixa são selecionadas ele recebe o nome de siPLS (*synergy interval partial least squares*) (FRANCESQUETT *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de modelo quimiométrico envolve a seleção não apenas do método que será utilizado, mas também a seleção de um planejamento experimental com número significativo de amostras, obtenção das matrizes, seleção de melhores pré-processamentos, número de variáveis latentes, bem como a detecção de *outliers*.

#### 2.7.1.2 Planejamento experimental

A seleção do número adequado de amostras para o desenvolvimento de modelo quimiométrico é essencial, pois deve-se tomar cuidado para que a escolha seja significativa e represente adequadamente o sistema. A norma ASTM E1655-05 (2012) tem algumas recomendações para o desenvolvimento de um modelo de calibração adequado por espectrofotometria, como por exemplo: o número de amostras para o conjunto de calibração deve ser igual a 6x (o número de variáveis latentes +1) e o número de amostras para o conjunto de validação igual a 4x (o número de variáveis latentes).

O uso de planejamento experimental torna o processo de seleção das amostras mais confiável, pois a influência de todas as variáveis, fatores e efeitos de interação na resposta são investigados (LUNDSTEDT *et al.*, 1998). Planejamento do tipo composto central rotacional é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de três partes: o fatorial  $2^k$ , um ou mais pontos centrais e a parte axial, sendo  $k$  o número de fatores.

Uma característica importante desse tipo de planejamento é ele ser rotacional e ortogonal. A primeira característica providencia precisão igual de estimação em todas as direções e permite que a variância prevista seja constante para pontos situados à mesma distância do centro. A segunda característica propicia uma estimação independente para os coeficientes do modelo, ou seja, os efeitos principais e estimativas de interação são independentes (ATKINSON; DONEV, 1992).

#### 2.7.1.3 Seleção do número de variáveis latentes

A escolha do número de VLs é um ponto fundamental na qualidade de um modelo, pois um número de VLs abaixo do ideal pode resultar em modelos com baixa capacidade de previsão e incapacidade de reconhecer ligeiras mudanças espectrais. Por outro lado incluir um número excessivo de VLs pode resultar em sobreajuste dos dados, levando a resultados incorretos. Em geral, escolhe-se o número de variáveis latentes em função do menor valor de erro médio. Para essa avaliação, o uso de um conjunto de amostras externa pode ser utilizado, a fim de garantir a capacidade preditiva do modelo. A avaliação das diferenças entre os resultados finais previstos pelo modelo e os valores de referência é uma forma segura de otimizar o número de VLs a serem escolhidos (PASQUINI, 2003).

#### 2.7.1.4 Validação cruzada

Além da utilização de um conjunto de amostras externas ao modelo, um procedimento de validação cruzada, baseado no menor erro de previsão, pode ser utilizado na busca da otimização do número de VLs. A maneira mais comum de realizar a validação cruzada é através do *leave-one-out*, em que uma amostra do conjunto de calibração é retirada de cada vez e usada como amostras de validação, enquanto as outras são usadas na construção de um novo modelo. A média dos erros de previsão é calculada para cada número de variáveis latentes e o número que apresentar menor erro de previsão é escolhido. Quando o número de amostras de calibração for superior a 20, outras alternativas de validação cruzada são recomendadas, tais como divisão em blocos contínuos, subconjuntos aleatórios ou *venetians blinds* (BRERETON, 2000; SENA, 2004; BARTHUS; MAZO; POPPI, 2007).

#### 2.7.1.5 Pré-processamentos

Na espectroscopia no infravermelho aliada a quimiometria, um ponto a ser considerado é o tratamento dos dados espectrais como forma de minimizar interferências como diferenças de espalhamento na luz, que em geral, se manifestam como variações não lineares na linha de base do espectro. Os pré-processamentos mais utilizados são centrar os dados na média, correção do espalhamento multiplicativo (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*), variação normal padrão (SNV, *Standard Normal Variate*) e derivatização com alisamento Savitzky-Golay (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009).

Centrar os dados na média consiste em calcular a média da intensidade para cada comprimento de onda espectral e depois, subtrair esta média de todas as intensidades. Assim, as coordenadas são movidas para o centro dos dados, facilitando a percepção de diferenças nas intensidades relativas das variáveis (SOUZA; POPPI, 2012). MSC baseia-se na remoção de artefatos oriundos de

variância de origem física (espalhamento indesejável de luz devido à diferença no tamanho de partículas, superfície granulosa, opacidade) sejam removidos da matriz dos dados antes da etapa de modelagem. Na SNV a correção espectral corresponde a razão entre a diferença do espectro original de uma amostra com o valor médio desse espectro pelo desvio padrão de cada espectro (RINNAN; VAN DEN BERG; ENGELSEN, 2009; SOUZA; POPPI, 2012). A derivatização e alisamento pelo algoritmo Savitzky-Golay é um procedimento que tem como principal objetivo aumentar a razão sinal/ruído, suavizando o espectro para eliminar variação aleatória. Ele realiza o melhor ajuste através de um polinômio quadrático com pontos sucessivos e determina o ponto central de melhor ajuste para o ajuste polinomial como forçado pelo segmento de dados (WORKMAN JR; WORKMAN, 2001).

#### 2.7.1.6 Detecção de *outliers*

*Outliers* ou amostras anômalas são termos utilizados para definir amostras muito diferentes em relação a um determinado conjunto de dados de calibração, podendo ter origem por erros operacionais, instrumentais ou por pertencerem a outros conjuntos de dados. A presença de amostras anômalas num conjunto de dados de calibração pode conduzir a modelos de baixa capacidade de previsão, levando a resultados que indicam que o modelo não é adequado ou que a sua capacidade é inferior á que seria apresentada, se essas amostras não estivessem presentes. A detecção de *outliers* é um aspecto crucial na construção de modelos de calibração multivariada, e a adequada exclusão dos *outliers* assegura uma melhor capacidade de previsão (FERREIRA *et al.*, 1999; VALDERRAMA, 2005; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007).

Diferentes ferramentas podem ser utilizadas na detecção de *outliers* e a avaliação gráfica dos resíduos de *Student versus Leverage* é uma opção na avaliação da qualidade do modelo (FERREIRA *et al.*, 1999; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; SILVA *et al.*, 2012). No caso de uma amostra ultrapassar os limites de resíduos de *Student* ou *Leverage* ela não deve ser automaticamente

eliminada do modelo, mas somente no caso de ultrapassar os dois a tendência da amostra é ser retirada do modelo caso não se descubra a fonte do erro.

O resíduo de *Student* verifica se a amostra está ou não dentro de uma distribuição normal dos dados, com um nível de confiança de 95%. Como a unidade de desvio padrão do valor médio é utilizada para definir esse parâmetro, os valores para o resíduo de *Student* são definidos como  $\pm 2,5\%$ . Valores acima destes indicam que alguma amostra possui um valor da propriedade de interesse (Matriz Y) significativamente diferente do valor esperado ou apresentado pela técnica de referência, sendo então considerados *outliers* (FERREIRA *et al.*, 1999).

O *leverage* representa o quanto uma amostra está distante da média do conjunto de observações, ou seja, indica a influência de uma amostra em relação às demais amostras do mesmo conjunto. Podendo ser interpretada geometricamente como a distância de uma amostra ao centróide do conjunto de dados. Quando a amostra influencia pouco no conjunto de calibração, ela tem baixo valor de *leverage*, porém, quando uma amostra apresenta um valor de *leverage* acima de um valor limite é considerada um *outlier* e pode ser removida do modelo. O limite é calculado como  $3VL/n$ , no qual VL corresponde ao número de variáveis latentes e n ao número de amostras utilizadas. (FERREIRA *et al.*, 1999; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2007; SILVA *et al.*, 2012).

## 2.8 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido, existe a necessidade de se averiguar se o mesmo apresenta uma performance adequada para as condições nas quais será aplicado. Esse processo de averiguação é conhecido como validação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). A validação é o processo que confere maior confiabilidade na aceitação dos resultados, garantindo que as características de desempenho do procedimento analítico satisfaçam os requisitos das aplicações que o método analítico se propõe (USP, 2013).

A validação é uma parte indispensável no desenvolvimento de procedimentos analíticos, normalmente é realizada de acordo com de órgãos regulatórios nacionais ou internacionais. No Brasil, quando realizada por indústrias

ou laboratórios farmacêuticos, normalmente é regulamentada pela ANVISA ou INMETRO, ICH, entre outros (BRASIL, 2003; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

#### 2.8.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM/EM)

A ANVISA, através da Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003, disponibiliza um guia para validação de métodos analíticos. Os parâmetros de validação a serem realizados dependem da aplicação e do propósito do procedimento. Os métodos classificados em categorias, de acordo com a finalidade, as quais exigem determinados parâmetros (QUADRO 2 e 3) (BRASIL, 2003).

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES SEGUNDO SUA FINALIDADE

FONTE: Brasil, 2003.



Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

QUADRO 3 – PARAMETROS NECESSÁRIOS PARA A VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO SEGUNDO SUA FINALIDADE

FONTE: Brasil, 2003.

NOTA: \* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico. \*\* Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Dentro deste contexto, a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM/EM) desenvolvida neste trabalho, enquadra-se, segundo sua finalidade, na categoria I. Os parâmetros relacionados nessa categoria são descritos a seguir.

#### 2.8.1.1 Seletividade e especificidade

É definido como a capacidade que o método possui em avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que já se espera encontrar na matriz, produtos de degradação e impurezas (BRASIL, 2003).

Este parâmetro pode ser avaliado de diferentes formas. Para análises quantitativas e análises de impurezas a seletividade pode ser determinada

comparando-se as análises de amostras contaminadas com quantidades adequadas de impurezas ou outros componentes (possíveis interferentes) e análises de amostras não contaminadas. Essa comparação deve demonstrar que os resultados não são afetados pela presença desses componentes. Testes de pureza de pico cromatográfico podem ser úteis para mostrar que o pico cromatográfico do analito não é atribuído a mais de um componente (BRASIL, 2003). Outra forma é através do método de adição de padrão. Neste experimento é feito uma curva analítica com a adição do analito na amostra que depois é comparada a uma curva analítica do analito sem a presença da matriz. Se não houver interferência de um componente da matriz nos analitos, as curvas analíticas se mostrarão paralelas (RIBANI *et al.*, 2004).

#### 2.8.1.2 Linearidade e curva de calibração

A linearidade é definida como a capacidade do método analítico demonstrar como os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2003).

Para construção da curva de calibração, devem ser analisadas no mínimo cinco diferentes concentrações de analito, contemplando de 80 a 120% da concentração teórica do teste. Após uma avaliação visual do gráfico, se houver linearidade aparente, os resultados devem ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (DPR). Caso não haja correlação linear, deve-se realizar transformação matemática (BRASIL, 2003).

### 2.8.1.3 Intervalo

O intervalo é definido como a faixa entre o limite inferior e superior de quantificação de um método analítico, os quais tenham sido determinados com adequado nível de precisão, exatidão e linearidade (BRASIL, 2003).

### 2.8.1.4 Precisão

A precisão é a avaliação do grau de concordância entre os resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão avalia três níveis: precisão intermediária, repetibilidade e reprodutibilidade (BRASIL, 2003).

A precisão intermediária ou precisão intercorridas é definida como a concordância de resultados obtidos num mesmo laboratório, mas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Recomenda-se o mínimo de dois dias diferentes e analistas diferentes para a precisão intermediária (BRASIL, 2003).

A repetibilidade ou precisão intracorridas é definida como a concordância dos resultados obtidos num curto período de tempo realizados pelo mesmo analista e instrumentos, no mesmo laboratório. É verificada por no mínimo nove determinações, contemplando o intervalo linear do método ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

A reprodutibilidade é definida como a concordância dos resultados obtidos em laboratórios diferentes (BRASIL, 2003).

A precisão deve ser expressa pelo DPR, o qual é calculado através da equação (4):

$$DPR = \frac{dp}{CME} \times 100 \quad (4)$$

Onde  $dp$  é o desvio padrão e CME é a concentração média experimental (BRASIL, 2003).

#### 2.8.1.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos nesse método em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada aplicando-se o método analítico a um padrão de referência ou comparando-se os resultados obtidos por esse método a um segundo método já validado (BRASIL, 2003).

Esse ensaio deve ser realizado após a determinação da seletividade, linearidade, intervalo e precisão. Devem ser avaliadas no mínimo nove amostras, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), sendo que cada uma deve ser feita em triplicata. A exatidão é expressa pela comparação da média da concentração obtida experimentalmente e a concentração teórica correspondente, calculando-se segundo a equação (5):

$$Exatidão = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad (5)$$

Onde CME é a concentração média experimental; CT é a concentração teórica (BRASIL, 2003).

Para formas farmacêuticas, o ensaio pode ser realizado adicionando-se o analito de interesse à mistura de excipientes ou, quando essa não está disponível, pode-se adicionar padrão de referência ao medicamento. Para avaliação de impurezas e/ou produto de degradação, quantidades conhecidas desses podem ser adicionados ao medicamento ou, quando não disponíveis, pode-se comparar os resultados do método em questão com um método já validado (BRASIL, 2003).

#### 2.8.1.6 Robustez

Esse parâmetro mede a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. A avaliação da robustez deve ser considerada durante o desenvolvimento do método (BRASIL, 2003).

Para CLAE, alguns dos principais fatores que devem ser considerados são os diferentes lotes e marcas de colunas, temperatura, fluxo e pH da fase móvel. No preparo de amostras, o tempo de extração e temperatura são exemplos de variáveis (BRASIL, 2003).

#### 2.8.1.7 Estabilidade das soluções

Este item não é contemplado na RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003). No entanto, para gerar resultados confiáveis e precisos, deve-se determinar por quanto tempo as amostras e os padrões usados são estáveis nas condições do método e laboratório. Este parâmetro deve ser demonstrado simulando as condições em que padrão e amostra são submetidos, podendo ser realizados de forma concorrente aos ensaios de validação (RIBANI *et al.*, 2004; BRASIL, 2011).

No caso de medicamentos, a estabilidade na forma farmacêutica já é contemplada no momento de registro do medicamento. Sendo assim, o estudo visa a demonstrar apenas a estabilidade dos analitos após o preparo analítico em solução. Preferencialmente devem-se avaliar períodos superiores ao tempo máximo previsto entre o armazenamento da solução e o início da análise. Para os padrões deve-se avaliar a estabilidade de igual forma, considerando as condições e período de armazenamento nos quais a solução é submetida. Valores de degradação inferiores a 2%, em relação a uma referência recém preparada são aceitáveis para padrões (BRASIL, 2011).

#### 2.8.1.8 Efeito residual (*carryover*)

A RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), não relaciona o efeito residual como parâmetro a ser avaliado durante a etapa de validação de métodos analíticos por cromatografia. No entanto, legislação mais atualizada como a Resolução de Diretoria Colegiada – (RDC) nº 27 de 2012, a qual dispõe sobre validação de métodos bioanalíticos, inclui esse parâmetro como ponto a ser avaliado. Apesar de não constar como obrigatório, avaliar esse parâmetro torna-se importante para evitar a expressão de falsos resultados.

O efeito residual pode ser definido como o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal dos analitos ou padrão interno, causado por contaminações provenientes de amostras analisadas anteriormente. Trata-se de um ensaio que visa garantir que a amostra anterior não interfira na amostra seguinte, em função de resíduos retidos na coluna cromatográfica ou em qualquer outra parte do equipamento. A RDC nº 27 de 2012 também prevê que se o efeito residual for inevitável, procedimentos específicos devem ser adotados na execução do método com o objetivo de controlar seu efeito, evitando que a precisão e a exatidão do método sejam afetadas (BRASIL, 2012).

#### 2.8.2 Calibração Multivariada e infravermelho médio

A validação de métodos cromatográficos e espectrofotométricos com dados de natureza univariados já é bem consolidada por órgãos reguladores nacionais e internacionais, como a ANVISA, INMETRO, ICH, entre outros. Entretanto, a validação de modelos multivariados ainda é pouco descrita e quase não se tem documentos oficiais para auxiliar nos processos de validação. No caso da calibração multivariada, alguns parâmetros, também chamados de figuras de mérito, como exatidão, precisão e robustez podem ser estimados de maneira bastante similar aos métodos de calibração univariada. Por outro lado, a estimativa das figuras de mérito

como linearidade, sensibilidade, razão sinal/ruído e seletividade não pode ser comparada a esses métodos tradicionais (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

No caso da calibração multivariada a norma mais utilizada é a E-1655-05 da ASTM, que regula a validação de métodos analíticos baseados em espectroscopia no infravermelho. Essa norma, para o desenvolvimento de análises quantitativas usando espectroscopia infravermelho, trata de recomendações relativas à preparação das amostras dos conjuntos de calibração e validação interna, aos parâmetros estatísticos para avaliar, otimizar e recalibrar modelos de calibração, entre outras (ASTM, 2012).

#### 2.8.2.1 Seletividade

Em calibração univariada a seletividade é a capacidade que um método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Em calibração multivariada, a seletividade (SEL) corresponde ao grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e o sinal dos interferentes presentes na amostra e indica a parte de sinal que é perdida por essa sobreposição (VESSMAN *et al.*, 2001). Para modelos de calibração multivariada, a seletividade pode ser estimada através do cálculo do Sinal Analítico Líquido – NAS (do inglês *Net Analyte Signal*).

NAS é definido como a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra, ou seja, representa a parte do sinal analítico que pode ser atribuída exclusivamente ao analito ou propriedade de interesse. Através do módulo do NAS, é possível calcular um valor escalar relacionado unicamente com a propriedade a ser determinada e assim construir uma nova representação dos dados multivariados, que agora pode ser representado de forma pseudo-univariada. Sua representação geométrica é descrita na FIGURA 6 (BRAGA; POPPI, 2004).

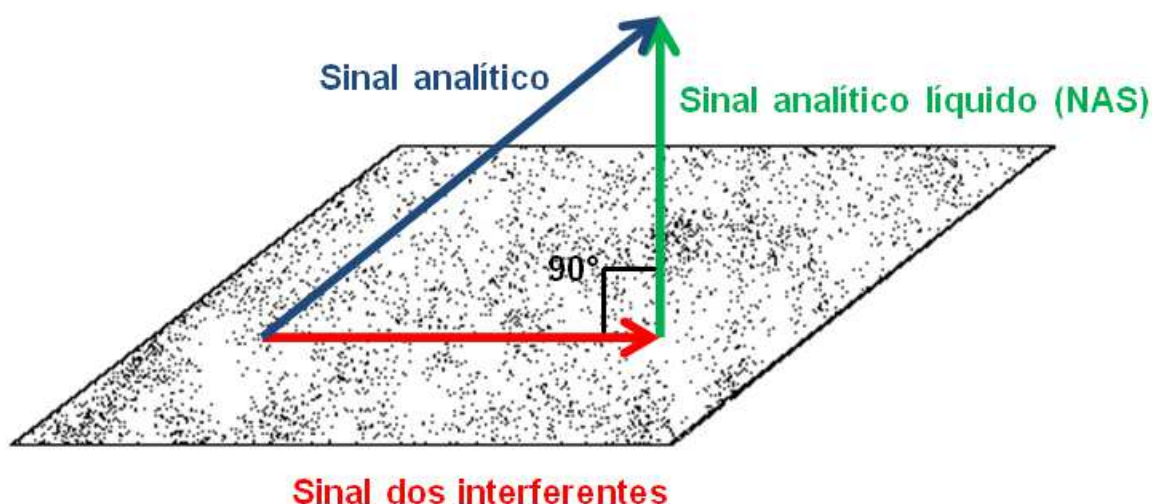


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DO VETOR NAS  
 FONTE: Adaptado de BRAGA; POPPI, 2004.

Como os métodos de calibração multivariada não necessitam de resolução de sinal, não é adequado estabelecer um valor limite para seletividade (VALDERRAMA, 2005; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012). Portanto, o resultado obtido não se refere ao sentido geralmente empregado para a seletividade, mas uma forma de estimar quanto do sinal espectroscópico é perdido por ortogonalidade (VALDERRAMA, 2005)

#### 2.8.2.2 Linearidade

Em calibração univariada, a linearidade de um procedimento analítico é a habilidade para obter resultados que sejam diretamente proporcionais entre as medidas instrumentais e as concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

Entretanto, na calibração multivariada, em especial na técnica que usa o PLS, esse cálculo é problemático, devido à decomposição das variáveis pelas variáveis latens (BRAGA; POPPI, 2004) (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Nesses casos a linearidade pode ser avaliada através da verificação do coeficiente de correlação ( $r$ ) do gráfico dos valores de referência versus os valores previstos.



Qualitativamente é possível avaliar a linearidade através do gráfico de resíduos das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório (BRAGA; POPPI, 2004). A aleatoriedade dos resíduos também pode ser observada através do gráfico da concentração dos valores de referência *versus* os valores preditos pelo modelo de PLS (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

#### 2.8.2.3 Sensibilidade

Para a calibração univariada, sensibilidade é a capacidade do método de distinguir com segurança duas concentrações próximas (ICH, 1996). É representada pela inclinação da curva de calibração. Consequentemente, a sensibilidade é o inverso da inclinação para o modelo inverso (OLIVIERI *et al.*, 2003).

Em calibração multivariada, a sensibilidade (SEN) é definida como a fração do sinal analítico responsável pelo acréscimo de uma unidade de concentração à propriedade de interesse (BRAGA; POPPI, 2004). Pode ser determinada conforme equação (6).

$$SEN = 1 / \| \mathbf{b} \| \quad (6)$$

Em que,  $\mathbf{b}$  é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

#### 2.8.2.4 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica ( $\gamma$ ) não é abordada em normas ou protocolos de validação de métodos, contudo ela apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração utilizada. É definida como a razão entre a sensibilidade e o ruído instrumental ( $\epsilon$ ), equação 7 (SENA *et al.*, 2007).

$$\gamma = SEN/\varepsilon \quad (7)$$

O inverso desse parâmetro ( $\gamma^{-1}$ ) permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, a qual pode ser distinguida pelo método, considerando o ruído aleatório experimental como a única fonte de erro, independentemente da técnica específica empregada (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013).

#### 2.8.2.5 Precisão

A precisão mede quanto os resultados obtidos de uma mesma amostra, em uma série de medidas, sobre as mesmas condições de análise, se aproximam entre si (BRASIL, 2003). Assim como para métodos univariados, geralmente é expressa pelo CV ou DPR, o qual é calculado através da equação (8):

$$CV = \frac{dp}{CME} \times 100 \quad (8)$$

Onde CV é o coeficiente de variação; dp é o desvio padrão e CME é a concentração média experimental (BRASIL, 2003). O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo da matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

#### 2.8.2.6 Exatidão

A exatidão demonstra o quanto um método analítico permite que os resultados encontrados estejam próximos dos resultados aceitos como valores reais convencionais ou valores de referência (BRASIL, 2003).

Na calibração multivariada, pode ser estimada uma exatidão média através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, *root mean square error of prediction*), que é uma aproximação do erro médio de previsão para amostras de validação. O RMSEP é definido por (Equação 9):

$$RMSEP = \sqrt{\sum[(y' - y)^2 / n]} \quad (9)$$

Onde,  $n$  representa o número de amostras do conjunto de validação,  $y'$  e  $y$  correspondem, respectivamente, aos valores de referência e aos previstos pelo modelo.

#### 2.8.2.7 Viés (Erro sistemático Bias)

Segundo a *International of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), o termo viés (teste para erro sistemático ou *bias*, em inglês) é definido como a diferença entre a média populacional e o seu valor verdadeiro. Erros sistemáticos são todas as componentes de erros que não são aleatórias, logo, eles correspondem à parcela fixa do viés em uma medida química. A existência de erro sistemático pode afetar outras figuras de mérito como a precisão e a exatidão (BRAGA; POPPI, 2004; FERREIRA; BRAGA; SENA, 2013). A norma E1655-05 da ASTM (ASTM, 2012), recomenda que um teste  $t$  seja realizado para avaliar se o viés incluso no modelo é significativo, podendo ser calculado como (equação 10):

$$Bias = \sum_{i=1}^{nv} \frac{(y_i^{ref} - \hat{y}_i)}{nv} \quad (10)$$

onde  $y_i^{ref}$  são os valores de concentração das amostras de referência,  $\hat{y}_i$  são os valores de concentração das amostras preditas e  $nv$  o número de amostras do conjunto de validação. Para o cálculo do  $t$  (equação 11) ainda é necessário o cálculo do desvio padrão dos erros de validação (SDV, *standard deviation of validation errors*), conforme equação (12):

$$t = \frac{[bias]\sqrt{nv}}{SDV} \quad (11)$$

$$SDV = \sqrt{\frac{\sum [(y_i^{ref} - \hat{y}_i) - bias]^2}{nv-1}} \quad (12)$$

Se o valor de  $t$  calculado for menor que o valor de  $t$  tabelado, para determinado  $nv-1$  graus de liberdade com 95% de confiança, significa que o viés pode ser considerado desprezível e insignificante (BRAGA; POPPI, 2004).

#### 2.8.2.8 Desvio residual de predição

O desvio residual de predição (RPD, *residual prediction deviation*) representa o quão bem o modelo de calibração prevê um conjunto de amostras, sendo a forma mais adequada para avaliar o desempenho de um modelo. É definido como a razão entre a variância natural dos valores de referência nas amostras de calibração ou validação e a magnitude dos erros que ocorrem na previsão (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

O RPD é calculado da seguinte forma (equações 13 e 14):

$$RDP_{cal} = DP_{cal} / RMSECV \quad (13)$$

$$RDP_{val} = DP_{val} / RMSEP \quad (14)$$

onde  $DP_{cal}$  é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de calibração e  $DP_{val}$  é o desvio padrão da concentração das amostras do conjunto de validação (FERREIRA; BRAGA; SENA, 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Amostra comercial de comprimidos de ARS e MFQ

Amostras comerciais ARS e MFQ (Farmanguinhos) foram gentilmente doadas pela FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, sendo sua composição, teor declarado de ativos, data de fabricação e validade apresentadas no QUADRO 4.

Lote	Composição de ativos	Teor declarado	Fabricação/Validade
13040347	Artesunato + Cloridrato de Mefloquina	100 mg + 220 mg/comprimido	04-2013 / 04-2016

QUADRO 4 – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA COMERCIAL DE COMPRIMIDOS CONTENDO A ASSOCIAÇÃO DE ARTESUNATO + CLORIDRATO DE MEFLOQUINA  
FONTE: O autor (2015).

Os comprimidos utilizados contêm em sua formulação os seguintes excipientes: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, corante azul laca FDC 2 e *opadry white*<sup>®</sup> (*Opadry white*<sup>®</sup> consiste de uma mistura de hidroxipropil metilcelulose, dióxido de titânio, polietilenoglicol e polisorbato 80).

##### 3.1.2 Padrões analíticos

As substâncias químicas utilizadas como padrões analíticos no desenvolvimento deste trabalho e algumas informações como peso molecular, teor e marca são descritas no QUADRO 5. As estruturas do ARS, MFQ e indometacina (padrão interno – PI) são mostradas na FIGURA 7.

Analito	Peso molecular (g.mol <sup>-1</sup> )	Teor (%)*	Marca
Artesunato	384,42	98,88	Farmacopéia Brasileira
Cloridrato de Mefloquina	414,78	98,00	Sigma-Aldrich
Indometacina (Padrão Interno)	357,77	99,37	CSPC OUYI Pharmac.

QUADRO 5 – DESCRIÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS UTILIZADAS

FONTE: O autor (2015).

NOTA: \* CONFORME DECLARADO NO LAUDO DO FORNECEDOR.

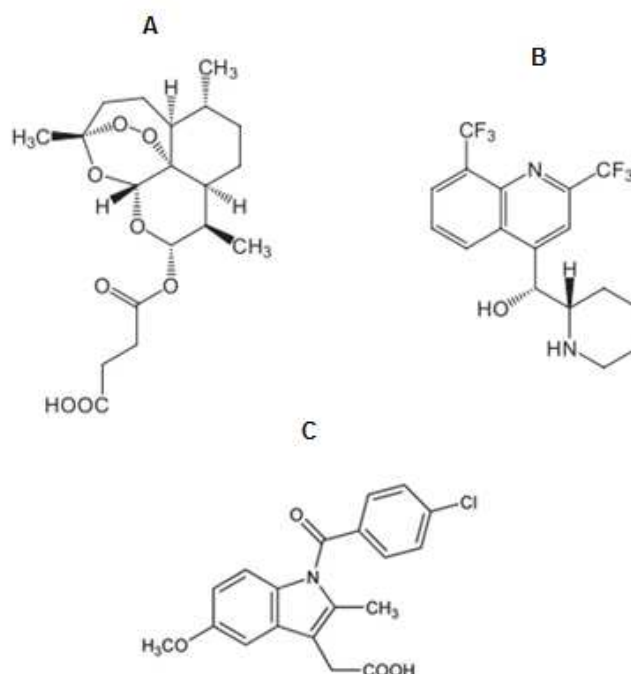


FIGURA 7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ARTESUNATO (A), MEFLOQUINA (B) E INDOMETACINA (C)

FONTE: The Merck Index (WILLIAMS, 2013)

### 3.1.3 Reagentes e solventes

Foram utilizados os seguintes reagentes e solventes: ácido fórmico 99% (v/v) (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Itália); acetonitrila e metanol grau CLAE (Tédia, Fairfield, USA); etanol 95% (FMaia, São Paulo, Brasil); formiato de amônio (> 97%)

(Acros Orgânicos, New Jersey, USA)); Água ultrapura Milli-Q (Millipore, Milford, EUA); Celulose microcristalina (DEG, São Paulo, Brasil); Croscarmelose sódica e estearato de magnésio (Indukern do Brasil Química Ltda., São Paulo, Brasil).

#### 3.1.4 Consumíveis e equipamentos

Foram utilizados os seguintes consumíveis e equipamentos: Agitador de amostras Mixer Glas-Col (Terre Haute, EUA); Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA); Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA); Cromatógrafo Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B (Wilmington, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Milford, EUA); Espectrômetro de massas triplo quadrupolo da Applied Biosystems, modelo API 3200 (Toronto, Canadá) equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus (South Natick, EUA) e interface *electrospray* (ESI); Purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA); Vortex, Genie 2 (Bohemia, EUA); Coluna a XBridge C18 (50 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA); Filtro de membrana Millipore Millex de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 e 0,45 µm de poro (Billerica, EUA); Pré-coluna XBridge C18 (10 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA); Pré-coluna XBridge C8 (10 x 2,1 mm; 5 µm), Waters (Milford, EUA); Tubo para centrifugação tipo Falcon, Techno Plastic Products AG (Trasadingen, Suíça); Espectrômetro na região do infravermelho BRUKER ALPHA-R FT-IV.

#### 3.1.5 Softwares

Statistica 10 (StatSoft INc.); Excel (Microsoft®); PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research, Inc.) operando em ambiente Matlab 7.0.1 (Math Work Inc.); OPUS (version 6.0) for windows software from Bruker Optik; Analyst, versão 1.4, (ABI/Sciex).

## 3.2 MÉTODO CLAE-EM/EM

### 3.2.1 Avaliação da solubilidade dos padrões analíticos

O uso da acetonitrila e metanol foi avaliado no preparo das soluções estoque. Para isso, soluções foram preparadas na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  submetendo-se à solubilização com auxílio de banho ultrassom por 10 minutos. As soluções foram mantidas em repouso por 3 horas a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e avaliadas individualmente quanto à formação ou não de precipitados. A ausência da formação de precipitados indica que a solubilidade no solvente é adequada à finalidade.

### 3.2.2 Preparo das soluções estoque dos padrões analíticos

Cada padrão foi pesado em balança analítica, corrigindo-se a massa de acordo com a base e teor, e solubilizados separadamente, atingindo-se concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ . O ARS e o cloridrato de MFQ foram diluídos em acetonitrila e a indometacina (PI) foi diluída em metanol. As soluções foram estocadas em freezer a  $-40^{\circ}\text{C}$  e protegidas da luz.

### 3.2.3 Preparo da solução amostra

Foi realizado o peso médio de 10 comprimidos e os mesmos foram triturados a fino pó com auxílio de gral e pistilo. Transferiu-se aproximadamente 115 mg (equivalente a  $\frac{1}{4}$  do peso médio dos comprimido) para tubo de Falcon e submeteu-se à extração com uma porção de 10 mL de metanol sob banho de ultrassom por 5 minutos. Após, o material foi centrifugado a 4000 rpm/5 minutos e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 25 mL. Esse procedimento extrativo foi



repetido com uma segunda porção de 10 mL de metanol e o volume do balão completado com o mesmo diluente. Dessa solução transferiu-se 100  $\mu\text{L}$  para um segundo balão de 10 mL, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de indometacina (PI) a 100.000  $\text{ng.mL}^{-1}$  e o volume do balão completado com metanol. A partir dessa solução foi preparada a solução analítica transferindo-se 50  $\mu\text{L}$  para balão volumétrico de 1 mL e volume completado uma mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2 v/v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico.

As concentrações teóricas obtidas foram: 500  $\text{ng.mL}^{-1}$  de ARS, 1000  $\text{ng.mL}^{-1}$  de MFQ e 100  $\text{ng.mL}^{-1}$  de indometacina (PI). Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22  $\mu\text{m}$  de poro).

#### 3.2.4 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

##### 3.2.4.1 Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas

A checagem do sinal dos analitos foi feita através de análise por infusão direta no espectrômetro de massas. Com o objetivo de definir a melhor condição de ionização dos analitos, esse experimento foi realizado preparando-se, separadamente, soluções de trabalho a 150  $\text{ng.mL}^{-1}$ , a partir das soluções estoque de padrões analíticos. Para esse experimento os diluentes usados foram mistura de metanol:água (1:1, v/v) e acetonitrila:água (1:1, v/v), e as concentrações do aditivo foram variadas conforme descrito no QUADRO 6. As soluções foram infundidas em bomba seringa a um fluxo de 10  $\mu\text{L.min}^{-1}$  na interface *electrospray*, no modo positivo de ionização. A posição do capilar foi mantida em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal.

Aditivos	Concentrações
Ácido fórmico	0,1 %
	0,5 %
	1,0 %

QUADRO 6 – PROPORÇÕES DE ADITIVO TESTADAS NA AVALIAÇÃO DOS SINAIS DOS ANALITOS

FONTE: O autor (2015).

#### 3.2.4.2 Monitoramento de reações múltiplas – MRM

As concentrações dos analitos foram variadas a fim de se obter uma intensidade de sinal entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps, sendo utilizado como diluente uma mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2 v/v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico. Os parâmetros potencial de desagrupamento (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na cela de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP) foram otimizados automaticamente, obtendo-se os íons fragmentos de cada analito.

#### 3.2.4.3 Análise por injeção em fluxo - FIA

O cromatógrafo líquido foi acoplado ao espectrômetro de massas para otimização dos parâmetros da fonte de ionização: gás de colisão (CAD); gás de interface (CUR); gás de nebulização (GS1); gás auxiliar (GS2); voltagem do capilar (IS); temperatura da fonte. Durante essa análise não foi utilizada coluna cromatográfica. Para esse parâmetro a fase móvel usada foi composta por mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2 v/v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, mantendo-se um fluxo de  $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de  $10 \mu\text{L}$  e os analitos estavam nas concentrações de  $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  de ARS,  $150 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  de MFQ e  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  de indometacina (PI).

### 3.2.5 Otimização dos parâmetros cromatográficos

A concentração estabelecida foi de 500 ng.mL<sup>-1</sup> de ARS, 1000 ng.mL<sup>-1</sup> de MFQ e 100 ng.mL<sup>-1</sup> de indometacina (PI). Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22 µm de poro).

#### 3.2.5.1 Preparo da fase móvel

Para a composição de fase móvel foram preparadas duas soluções: solução A (água contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v)) e solução B (mistura de acetonitrila e metanol (1:1, v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v)).

Essas soluções foram combinadas em diferentes proporções durante o desenvolvimento do método até se chegar à proporção mais adequada para a fase móvel, a qual ficou definida como a mistura 30:70 (v/v) de solução A e solução B.

#### 3.2.5.2 Otimização da cromatografia

A otimização cromatográfica foi realizada considerando-se o comportamento dos analitos com uma coluna cromatográfica XBridge: C18 (50 x 2,1 mm, 5 µm). O fluxo da fase móvel foi avaliado na faixa de 0,2—0,4 mL.min<sup>-1</sup>, a proporção de solvente orgânico foi avaliada na faixa de 50—70% e a temperatura da coluna foi testada na faixa de 25—40°C. Para injeção da amostra foram avaliados os volumes de 5 e 10 µL. A velocidade de aquisição dos dados (*Dwell time*) foi calculada em função do número de íons monitorados. Os ensaios foram realizados com solução de trabalho de padrões.

A seleção do sistema cromatográfico foi baseada nos resultados de melhor perfil cromatográfico com base nos parâmetros do espectrômetro de massa.

### 3.2.6 Teste de efeito residual (*carryover*)

O ensaio efeito residual foi conduzido através da injeção de uma solução de trabalho de padrões analíticos na concentração equivalente ao nível mais alto da curva de calibração, seguida pela injeção subsequente de dois brancos (solução diluente isenta dos analitos).

Para a realização desse ensaio a concentração da solução de trabalho dos padrões analíticos utilizada foi: 600 ng.mL<sup>-1</sup> de ARS, 1200 ng.mL<sup>-1</sup> de MFQ e 100 ng.mL<sup>-1</sup> de indometacina (PI) usando como diluente uma mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2, v/v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico.

Os picos presentes nas injeções do branco devem ser comparados com as amostras de concentração correspondente ao limite inferior de quantificação (LIQ). Para o método ser considerado isento de efeito residual, as áreas dos picos interferentes não devem ser significativas, ou seja, não devem ser superiores a 20% da área das amostras LIQ e 5% da área do padrão interno (BRASIL, 2012). O critério de escolha para a solução de limpeza foi baseado na capacidade de redução dos efeitos residuais entre as injeções das amostras.

### 3.2.7 Otimização do preparo da amostra

A avaliação do preparo da amostra foi realizada comparando-se a influência de diferentes tempos de banho de ultrassom no processo extrativo. O método de preparo utilizado foi realizado conforme o descrito no item 3.2.3 e os tempos de 5 e 10 minutos de banho de ultrassom foram avaliados em triplicata. Após o preparo de cada amostra, procedeu-se a re-extração, a fim de avaliar a presença ou não de resíduos dos analitos de interesse. O menor tempo de preparo aliado à extração integral dos ativos serviu de escolha para o modo de preparo da amostra.

### 3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

O método foi validado de acordo com os critérios estabelecidos na RE nº 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, para a categoria I, que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação de princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas (BRASIL, 2003). Os ensaios realizados na validação foram: seletividade, linearidade, intervalo, precisão e exatidão. Adicionalmente, avaliou-se a estabilidade das soluções estoque e analíticas.

A estabilidade das soluções foi avaliada para as soluções estoque de padrões e para as soluções de trabalho de padrões, de forma a definir os períodos máximos para o uso das soluções, sob determinadas condições de armazenagem.

#### 3.3.1 Seletividade

O parâmetro seletividade foi avaliado através do método de adição de padrão à amostra, devido ao fato de não estar disponível a matriz sem os analitos de interesse. Para tal, a curva analítica dos padrões foi construída conforme descrito no item 3.3.2.

A curva de amostra adicionada de padrão foi construída preparando-se uma amostra a 80% do ponto médio da curva de calibração. Para isso transferiu-se aproximadamente 115 mg (equivalente a  $\frac{1}{4}$  do peso médio dos comprimido) para tubo de Falcon, sendo a mistura submetida à extração com uma porção de 10 mL de metanol sob banho de ultrassom por 5 minutos. Após, o material foi centrifugado a 4000 rpm/5 minutos e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 25 mL. Esse procedimento extrativo foi repetido com uma segunda porção de 10 mL de metanol e o volume do balão completado com o mesmo diluente. Dessa solução transferiu-se 80  $\mu$ L para um segundo balão de 10 mL, adicionou-se 200  $\mu$ L de solução de padrão interno a 100.000 ng.mL<sup>-1</sup> e o volume do balão completado com metanol. A partir dessa solução foram preparadas cinco soluções analíticas transferindo-se 50  $\mu$ L para balão volumétrico de 1 mL e em quatro delas adicionou-

se quantidades crescentes de padrões dentro da faixa do intervalo analítico avaliado (QUADRO 7). Como diluente foi usada uma mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2 v/v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico. Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22 µm de poro).

Níveis da curva – amostra a 80% + padrões	Quantidades de padrões adicionadas (ng)		Concentração final (ng.mL <sup>-1</sup> )		
	Artesunato	Mefloquina	Artesunato	Mefloquina	Indometacina (PI)
1	-	-	400	800	100
2	50	100	450	900	100
3	100	200	500	1000	100
4	150	300	550	1100	100
5	200	400	600	1200	100

QUADRO 7 – QUANTIDADE DE PADRÕES ANALÍTICOS ADICIONADOS E CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NOS DIFERENTES NÍVEIS DA CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO

FONTE: O autor (2015).

NOTA: PI – padrão interno.

O resultado da seletividade foi avaliado verificando se a matriz não interfere no teste para cada nível de fortificação. Por teste F (*Fischer-Snedecor*) e por distribuição t de *Student* foi verificado se os desvios e a média entre os coeficientes angulares das curvas analíticas dos padrões e amostras adicionada de padrão são equivalentes. Para tanto, foi considerado os valores críticos com 95% de confiança (BRASIL, 2011).

### 3.3.2 Curva de calibração e intervalo

A partir das soluções-estoque foram preparadas três curvas de calibração contemplando 5 níveis na faixa de 80 a 120% da concentração teórica do teste (QUADRO 8). O intervalo de aplicação foi determinado pela faixa avaliada nos testes de exatidão, precisão e linearidade, ou seja, de 80 a 120% da concentração esperada para cada amostra. Antes das injeções, todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22 µm de poro).

O resultado da curva de calibração foi avaliado verificando-se a linearidade dentro do intervalo. Para tanto, considerou-se coeficiente de correlação ( $r$ ) de no mínimo 0,99, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão das amostras e incerteza dos coeficientes de regressão calculados. Também foram avaliados o perfil de distribuição dos resíduos no gráfico de resíduos gerados pela regressão linear.

Nível	Concentrações (ng.mL <sup>-1</sup> )		
	Artesunato	Mefloquina	Indometacina (PI)
1	400	800	100
2	450	900	100
3	500	1000	100
4	550	1100	100
5	600	1200	100

QUADRO 8 – CONCENTRAÇÕES DOS ANALITOS NOS DIFERENTES NÍVEIS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

FONTE: O autor (2015).

NOTA: PI – padrão interno.

### 3.3.3 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corrida). Para a determinação da repetibilidade, foram realizadas 6 análises de determinação para uma mesma amostra, a 100% da concentração do teste (comprimido contendo 100 mg de ARS e 200 mg de MFQ) pelo mesmo analista, mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada por 6 análises de uma amostra a 100% da concentração, executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento em um intervalo de tempo de 2 dias. Todos os preparos de amostras foram realizados de acordo com o item 3.2.3. Antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22  $\mu$ m de poro).

O resultado foi avaliado verificando-se o desvio padrão e DPR entre as 12 análises. A dispersão dos resultados foi avaliado através do DPR e as ferramentas

estatísticas Teste F e Teste t foram empregadas para comparação das médias obtidas para cada analito em cada ensaio.

#### 3.3.4 Exatidão

Como a matriz sem os analitos de interesse não está disponível, a exatidão foi determinada através do método de adição do padrão à amostra, sendo verificada a partir de 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 concentrações com três replicas cada, sendo elas: baixa, média e alta.

Para isso uma amostra foi preparada a 50% da concentração teste e, a ela, foram adicionadas quantidades suficientes de padrões para obterem-se concentrações teóricas de 80%, 100% e 120%. Para isso transferiu-se 115 mg (equivalente a  $\frac{1}{4}$  do peso médio dos comprimido) para tubo de Falcon e submeteu-se à extração com uma porção de 10 mL de metanol sob banho de ultrassom por 5 minutos. Após, o material foi centrifugado a 4000 rpm/5 minutos e o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 25 mL. Esse procedimento extrativo foi repetido com uma segunda porção de 10 mL de metanol e o volume do balão completado com o mesmo diluente. Dessa solução transferiu-se 50  $\mu\text{L}$  para um segundo balão de 10 mL, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de padrão interno a  $100.000 \text{ ng.mL}^{-1}$  e o volume do balão completado com metanol. A partir dessa solução foram preparadas soluções analíticas transferindo-se 50  $\mu\text{L}$  para balão volumétrico de 1 mL e adicionando quantidades crescentes de padrões (QUADRO 9). Como diluente foi usada uma mistura de metanol:acetonitrila:água (1:1:2 v/v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico e antes das injeções todas as soluções foram filtradas através de filtro de seringa de PVDF (0,22  $\mu\text{m}$  de poro).



Níveis – amostra a 50% + padrões	Quantidades de padrões adicionadas (ng)		Concentração final (ng.mL <sup>-1</sup> )		
	Artesunato	Mefloquina	Artesunato	Mefloquina	Indometacina (PI)
baixo	150	300	400	800	100
médio	250	500	500	1000	100
alto	350	700	600	1200	100

QUADRO 9 – QUANTIDADE DE PADRÕES ANALÍTICOS ADICIONADOS PARA OBTENÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES EXPERIMENTAIS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

FONTE: O autor (2015).

NOTA: PI – padrão interno.

O resultado foi avaliado como porcentagem da concentração recuperada de cada analito, quando comparada com a concentração teórica. O intervalo de  $\pm 5\%$  em relação ao valor nominal foi considerado como critério para avaliação do parâmetro de exatidão.

### 3.3.5 Teste de estabilidade

#### 3.3.5.1 Teste de estabilidade das soluções estoque

A estabilidade das soluções estoque foi avaliada em dois níveis de temperatura, a  $-40^{\circ}$  (armazenamento) e a  $25^{\circ}\text{C}$  (bancada). Para a avaliação da estabilidade, uma solução estoque de cada analito foi preparada de acordo com o item 3.2.2 e fracionada em 3 partes de igual volume. Duas foram armazenadas em refrigeração a  $-40^{\circ}\text{C}$  e avaliadas após períodos de 14 e 30 dias. Para a avaliação da estabilidade de bancada, a solução estoque foi mantida sob temperatura aproximada de  $25^{\circ}\text{C}$ , ao abrigo da luz, e avaliada após período de 6 horas. Como resultado de referência para comparação, a mesma fração utilizada para a avaliação de bancada teve uma alíquota imediatamente diluída e analisada obtendo-se o resultado de tempo zero.

As amostras em avaliação foram diluídas até se obter as concentrações de  $500 \text{ ng.mL}^{-1}$  (ARS) e  $1000 \text{ ng.mL}^{-1}$  (MFQ), conforme descrito no item 3.3.2. As

amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM.

A estabilidade foi avaliada através de ferramentas estatísticas de Teste F e Teste t para comparação dos resultados de cada analito em estabilidade com amostras tempo zero.

#### 3.3.5.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho

Solução de padrões e solução amostra foram preparadas de acordo com o item 3.2.2 e 3.2.3, e mantidas sob temperatura de 8°C, ao abrigo da luz, por períodos de 24 horas. As amostras foram filtradas em filtro de PVDF 0,22 µm antes das análises por CLAE-EM/EM.

A estabilidade foi avaliada através de ferramentas estatísticas de Teste F e Teste t para comparação dos resultados de cada analito em estabilidade e de amostras recém preparadas.

### 3.4 MÉTODO POR IVM-PLS

#### 3.4.1 Seleção dos excipientes

Para a construção de um modelo de calibração multivariada é necessária a inclusão dos interferentes (excipientes) presentes na amostra, que neste caso são: celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, corante azul laca FDC 2 e *opadry White*®.

Devido à ausência de acesso às informações do fabricante com relação à composição quantitativa dos excipientes no comprimido, foi necessária uma avaliação farmacotécnica prévia para a determinação da composição quantitativa aproximada dos excipientes na formulação. Com base nas informações da bula,

funções farmacotécnicas mais comuns e respectivas proporções em função do uso, a formulação para estudo ficou definida como (TABELA 1):

TABELA 1 – SUGESTÃO DE COMPOSIÇÃO PERCENTUAL QUANTITATIVA DOS COMPONENTES PRESENTES NO COMPRIMIDO

Componente	Função	% no comprimido
Artesunato	Ativo	21,70
Cloridrato de Mefloquina	Ativo	47,80
Celulose microcristalina	Excipiente (diluente)	19,50
Croscarmellose sódica	Excipiente (desintegrante)	3,50
Estearato de magnésio	Excipiente (lubrificante)	0,50
Corante azul laca FDC 2 e <i>opadry White</i> <sup>®</sup>	Revestimento	7,00

FONTE: O autor (2015).

De posse de uma formulação de referência, a seleção dos excipientes para o planejamento experimental foi realizada. Devido ao fato do comprimido apresentar um revestimento facilmente removível optou-se por não considerar o mesmo no planejamento e também por apresentar-se como um interferente em potencial.

### 3.4.2 Planejamento experimental

O primeiro passo para a construção de um modelo quimiométrico é fazer a seleção de um número significativo de amostras de calibração e validação, capaz de representar o sistema em estudo. Outro ponto a se considerar é o intervalo de aplicação que se pretende avaliar com o método. Normalmente, especificações de teor de medicamentos compreendem intervalos de 90 a 110% do teor declarado, no entanto, testes como a uniformidade de conteúdo admitem variações de até no máximo  $\pm 25\%$  (BRASIL, 2010).

Neste trabalho, as proporções dos ativos foram variadas de acordo com um delineamento experimental de três fatores (dois fármacos + excipiente majoritário), a faixa de variação dos fármacos foi estabelecida em  $\pm 25\%$  da especificação do produto. No caso dos excipientes minoritários (croscarmellose sódica e estearato de

magnésio), em função das baixas concentrações e consequentemente pouca influência na construção dos modelos, optou-se por não variar a concentração dos mesmos. Já para o excipiente celulose microcristalina, a variação foi suficiente para conferir à mistura uma soma total equivalente 100% (TABELA 1).

O planejamento experimental escolhido para o desenvolvimento do método espectroscopia no IVM-PLS foi do tipo composto central completo (CCD). Este procedimento destina-se a obter um modelo representativo e robusto, que seja capaz de prever amostras com composição de excipientes diferentes no intervalo estudado (XIANG *et al.*, 2009). Com esse planejamento também é possível obter um pequeno número de experimentos com o mesmo número de fatores que em um planejamento fatorial completo e, além disso, têm-se as vantagens de rotabilidade e ortogonalidade (pontos axiais) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). As amostras para os conjuntos de calibração e validação foram obtidas com o auxílio do software *Statistica 10.0*, distribuídas de acordo com a FIGURA 8. O número de amostras de calibração e validação foram escolhidas de acordo com o que recomenda a norma ASTM E1655-05 (2012), que cita o número de amostras de calibração como 6x (o número de variáveis latentes +1) e o número de amostras de validação como 4x (o número de variáveis latentes), bem como o número de amostras depende da complexidade da mistura.

Como o delineamento experimental inicialmente proposto foi para três fatores (dois fármacos e excipiente majoritário), um mínimo de três variáveis latentes foi estipulado para o planejamento. Para atender o recomendado pela norma ASTM E1655-05 37 misturas dos padrões e excipientes foram preparadas, sendo separadas 25 amostras para o conjunto de calibração e 12 amostras para o conjunto de validação.

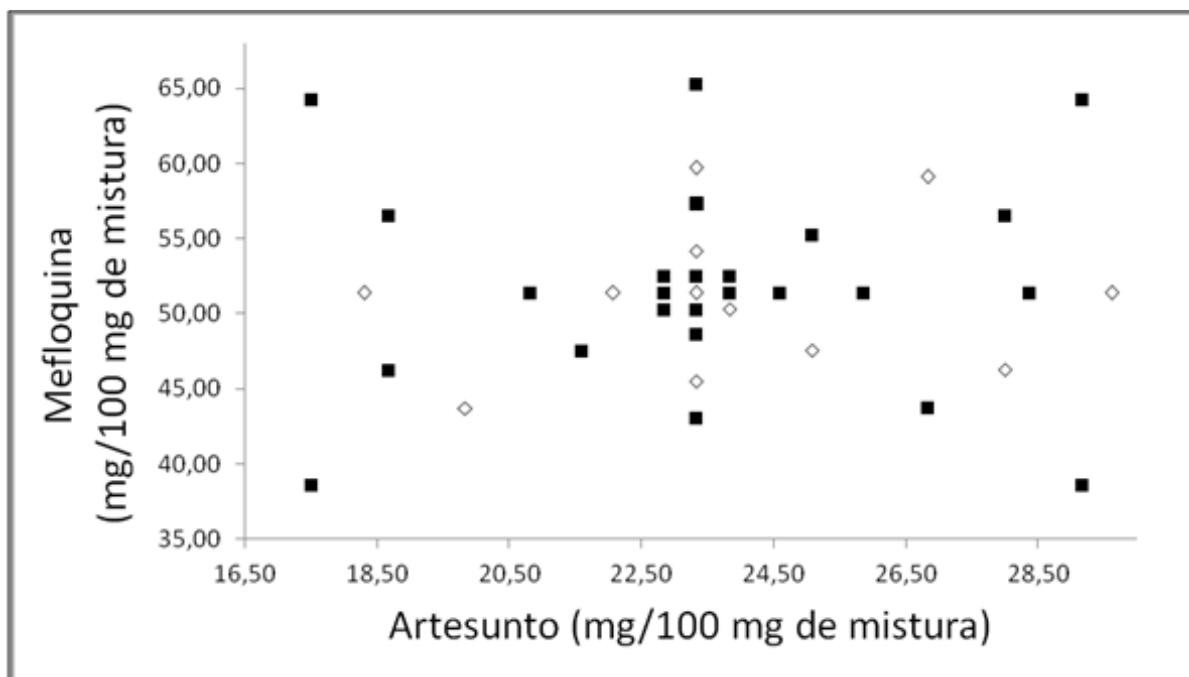


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO PLANEJAMENTO DO TIPO COMPOSTO CENTRAL DAS AMOSTRAS DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA

FONTE: O autor (2015).

Nota: QUADRADOS NEGROS: AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO; LOSANGOS BRANCOS: AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO.

### 3.4.3 Preparo das amostras para a construção do modelo multivariado

Para cada amostra foi pesada a quantidade necessária de ARS, MFQ e excipientes, estabelecidas pelo planejamento experimental. Os valores pesados para os ativos foram corrigidos de acordo com a base e teor. No caso da mistura de excipientes minoritários, devido à baixa quantidade para pesagem nas amostras, foi realizada uma mistura binária proporcional à formulação (TABELA 1) e a mesma foi pesada igualmente para todas as amostras.

A mistura de pós foi homogeneizada em gral e pistilo de ágata pelo método de diluição geométrica para garantir a distribuição uniforme das matérias-primas na mistura total. As TABELAS 2 e 3 apresentam as quantidades pesadas para cada amostra, com valores corrigidos para uma mistura final de 100 mg.

TABELA 2 – QUANTIDADES UTILIZADAS DE ARTESUNATO, MEFLOQUINA E EXCIPIENTES NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO (25 AMOSTRAS)

Amostra	Artesunato (mg)	Mefloquina (mg)	Celulose microcristalina (mg)	Mistura de Croscarmelose sódica + Estearato de magnésio (mg)	Total (mg)
1	23,35	52,51	19,83	4,31	100,00
2	22,80	52,46	20,37	4,37	100,00
3	22,80	51,38	21,48	4,34	100,00
4	22,79	50,29	22,61	4,30	100,00
5	23,33	50,29	22,08	4,31	100,00
6	23,86	52,53	19,31	4,30	100,00
7	23,79	51,36	20,47	4,38	100,00
8	23,32	48,58	23,74	4,37	100,00
9	24,60	51,37	19,67	4,35	100,00
10	25,07	55,23	15,32	4,39	100,00
11	21,66	47,49	26,48	4,36	100,00
12	20,81	51,43	23,42	4,34	100,00
13	25,85	51,42	18,41	4,32	100,00
14	19,82	43,71	32,15	4,32	100,00
15	23,36	43,08	29,24	4,32	100,00
16	23,37	59,70	12,62	4,31	100,00
17	26,85	59,10	9,71	4,35	100,00
18	23,33	45,41	26,88	4,37	100,00
19	18,67	56,53	20,46	4,35	100,00
20	27,97	56,48	11,16	4,39	100,00
21	29,59	51,38	14,64	4,39	100,00
22	17,50	38,58	39,60	4,31	100,00
23	29,16	64,24	2,30	4,30	100,00
24	29,17	38,56	27,97	4,30	100,00
25	23,28	65,23	7,13	4,36	100,00

FONTE: O autor (2015).

TABELA 3 – QUANTIDADES UTILIZADAS DE ARTESUNATO, MEFLOQUINA E EXCIPIENTES NA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO (12 AMOSTRAS)

Amostra	Artesunato (mg)	Mefloquina (mg)	Celulose microcristalina (mg)	Mistura de Croscarmelose sódica + Estearato de magnésio (mg)	Total (mg)
26 <sup>a</sup>	23,32	51,38	20,93	4,36	100,00
27	23,82	50,27	21,53	4,38	100,00
28	22,08	51,35	22,20	4,37	100,00
29	23,32	54,14	18,20	4,35	100,00
30	25,06	47,54	23,04	4,36	100,00
31	26,82	43,65	25,15	4,38	100,00
32	27,96	46,23	21,45	4,36	100,00
33	18,68	46,28	30,73	4,31	100,00
34	23,35	57,31	15,02	4,33	100,00
35	18,28	51,38	25,97	4,37	100,00
36	28,33	51,37	15,93	4,36	100,00
37	17,49	64,25	13,92	4,34	100,00

FONTE: O autor (2015).

NOTA: <sup>a</sup> PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL CONSIDERANDO FORMULAÇÃO DEFINIDA NA TABELA 1, COM CORREÇÃO EM FUNÇÃO DA RETIRADA DO REVESTIMENTO.

#### 3.4.4 Aquisição dos espectros de infravermelho

As amostras foram transferidas para o aparato (porta amostra) do módulo de reflectância difusa (*DRIFT*) do espectrômetro na região do infravermelho (médio e próximo) para a aquisição dos espectros. Os espectros foram adquiridos com auxílio do *software* OPUS na região de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup>, para as análises na região do IVM, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 32 *scans*. A aquisição foi realizada sob temperatura (20,0 ± 0,2°C) e umidade (45-55%) controlada.

#### 3.4.5 Desenvolvimento do modelo multivariado de calibração

Os modelos multivariados de calibração foram desenvolvidos utilizando o programa *PLS-Toolbox* 3.0, operando em ambiente *Matlab* 7.0.1. Inicialmente

diversos modelos foram construídos pelo método PLS através da combinação de diferentes pré-processamentos (centrar os dados na média, MSC, SNV e primeira derivada e alisamento Savitzky-Golay) e da técnica de validação cruzada *leave-one-out*.

Além de utilizar o espectro completo na construção de modelos, também foram avaliadas a seleção de variáveis *i*PLS e *s*PLS, considerando-se os intervalos de tamanho 319, 255, 213, 182, 159 e 91  $\text{cm}^{-1}$ . Estes valores foram obtidos através da divisão dos números de pontos gerados pelo equipamento (2550 pontos), dentro da faixa avaliada de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , por 8, 10, 12, 14, 16 e 28 faixas respectivamente. Os parâmetros foram definidos com o número de intervalos automático, número de variáveis latentes máximo igual a 3 e modo *forward*. A escolha dos melhores modelos de calibração multivariada foi realizada com base nos valores de *RMSEC* (raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração), *RMSECV*, *RMSEP* e erro percentual médio de predição.

A presença de amostras anômalas também foi avaliada, uma vez que estas podem afetar adversamente a capacidade preditiva do modelo. Esta avaliação foi feita analisando os valores dos resíduos de *Student* e *Leverage*.

### 3.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR IVM-PLS

O processo de validação foi realizado considerando as figuras de mérito aplicáveis a modelos de calibração multivariada e pelas recomendações nacionais e internacionais (ICH, 1996; BRASIL, 2003; INMETRO, 2007; ASTM, 2012).

#### 3.5.1 Seletividade

A seletividade foi estimada através do cálculo do NAS. NAS é definido como a fração do sinal analítico que é ortogonal ao sinal dos interferentes presentes na amostra, ou seja, representa a parte do sinal analítico que pode ser atribuída



exclusivamente ao analito ou propriedade de interesse. Sua definição é apenas útil dentro de um determinado grupo de amostras de composição qualitativa semelhante, e sua estimativa indica aproximadamente quanto do sinal analítico foi utilizado para estimar a concentração de cada um dos analitos.

### 3.5.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da verificação do coeficiente de correlação ( $r$ ) do gráfico dos valores de referência versus os valores previstos. Qualitativamente também avaliou-se a linearidade através da avaliação da distribuição do gráfico de resíduos dos erros das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório.

### 3.5.3 Sensibilidade e sensibilidade analítica

A avaliação da sensibilidade foi realizada através da determinação da sensibilidade analítica, dividindo-se seus valores pela estimativa de ruído instrumental (Equação 6, p.63 e 7, p. 64). Também foi calculado o inverso da sensibilidade analítica, que indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erros.

### 3.5.4 Precisão

A precisão do método foi determinada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corrida). Para a determinação da repetibilidade, foram realizadas 6 análises de determinação para

uma mesma amostra, a 100% da concentração do teste, pelo mesmo analista, mesmo equipamento e em um curto espaço de tempo. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada por 6 análises da mesma amostra a 100% da concentração, executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento em um intervalo de tempo de 2 dias.

O resultado foi avaliado verificando-se o desvio padrão e DPR entre as 12 análises. A dispersão dos resultados foi avaliado através do DPR e as ferramentas estatísticas Teste F e Teste t foram empregadas para comparação das médias obtidas para cada analito em cada ensaio.

#### 3.5.5 Exatidão

A exatidão foi estimada através do valor de RMSEP, que é uma aproximação do erro médio de previsão para amostras de validação (Equação 9, p. 65).

#### 3.5.6 Viés e desvio residual de predição

O valor de *bias* foi estimado para as amostras de validação e a avaliação foi feita através de um teste t considerando um intervalo de 95% de confiança (Equação 10, 11 e 12, p. 65; 66).

O RPD foi calculado para as amostras de calibração e validação de acordo com as equações 13 e 14, p. 66.

### 3.6 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

#### 3.6.1 Análise por IVM-PLS

Foi realizada a quantificação de ARS e MFQ em 5 comprimidos comerciais. No preparo das amostras foi retirado o revestimento. Na sequência foram triturados, homogeneizados e cada comprimido teve o espectro adquirido de acordo com o item 3.4.4. Os dados espectrais obtidos foram inseridos no modelo multivariado desenvolvido e validado para determinação quantitativa dos analitos.

#### 3.6.2 Análise pelo método CLAE-EM/EM

Os mesmos 5 comprimidos, após avaliação pelo método IVM-PLS, foram avaliados pelo método por calibração foram quantificados por CLAE-EM/EM.

#### 3.6.3 Comparação da concordância de resultados entre métodos

O grau de concordância entre os métodos propostos, IVM-PLS e CLAE-EM/EM, foi avaliado e comparado estatisticamente usando um teste t para amostras independentes.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Dentre os solventes avaliados, todos os analitos de interesse solubilizaram completamente em acetonitrila e metanol. Considerando que a acetonitrila e o metanol proporcionaram boa solubilização para o ARS e o MFQ, e que a literatura cita o uso de ambos no preparo de soluções (LINDEGARDH *et al.*, 2007; HODEL *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013), a escolha do solvente da solução estoque foi pela acetonitrila, por essa ser um dos componentes da fase móvel. Para a diluição do padrão interno (PI) indometacina, a escolha do solvente foi pelo metanol, pois visualmente foi o diluente em que proporcionou solubilização mais rápida.

### 4.2 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

#### 4.2.1 Checagem de sinal dos analitos por infusão direta no espectrômetro de massas

Para o desenvolvimento do método a fonte ESI, foi selecionada em virtude das atribuições de robustez e sensibilidade. Baseado nos métodos encontrados na literatura, e também em características químicas dos analitos, o modo positivo de ionização foi o utilizado (HODEL *et al.*, 2009; LINDEGARDH *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013).

De acordo com a literatura o ARS é quantificado na forma de aduto de amônio  $[M+NH_4]^+$  (HODEL *et al.*, 2009; LINDEGARDH *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013). No entanto, sabe-se que é possível a formação de adutos de sódio  $[M+Na]^+$ . Como forma de avaliar a formação de possíveis adutos, espectros de varredura foram obtidos a partir de uma solução de analitos, contendo o ARS. Foram usados como

diluentes, mistura de metanol e água 1:1 (v/v) com 0,5% de ácido fórmico e também em mistura de em acetonitrila e água 1:1 (v/v) contendo 0,5% de ácido fórmico (FIGURA 9).

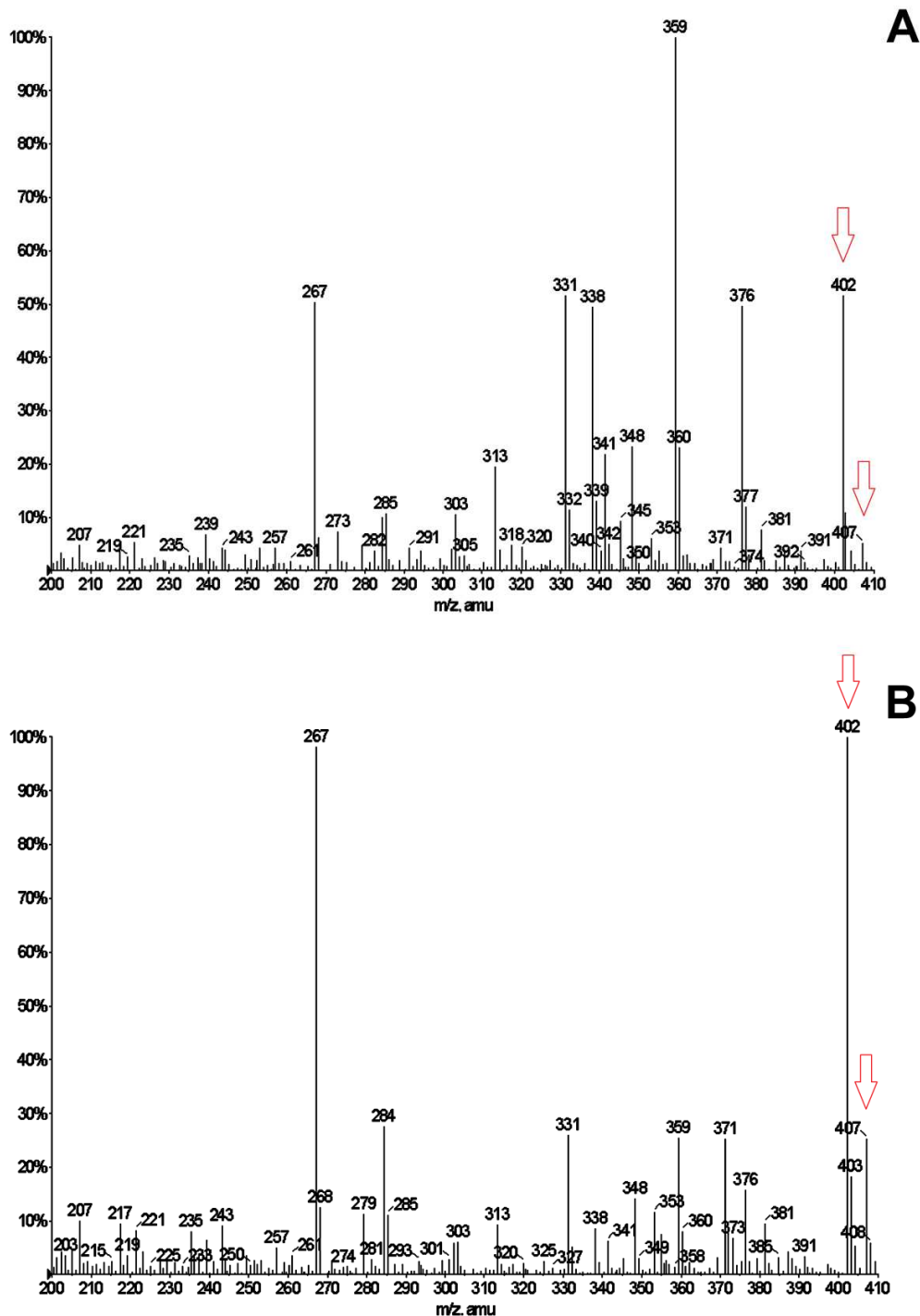


FIGURA 9 – ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 410  $m/z$ ) PARA VERIFICAÇÃO DE ADUTOS DO ARTESUNATO

FONTE: O autor (2015).

NOTA: A: diluente metanol e água 1:1 (v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico; B diluente acetonitrila e água 1:1 (v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico; Artesunato  $[M+Na]^+$   $m/z = 407,0$ ;  $[M+NH_4]^+$   $m/z = 402,2$ ; Concentração do Artesunato =  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$ .

Observou-se que em ambos os solventes houve a formação do aduto de amônio em maior intensidade, mesmo em metanol, o qual propicia a formação de adutos de sódio. Sendo assim, avaliou-se a intensidade do sinal dos analitos utilizando acetonitrila e água 1:1 (v/v) contendo diferentes concentrações de formiato de amônio (FIGURA 10).

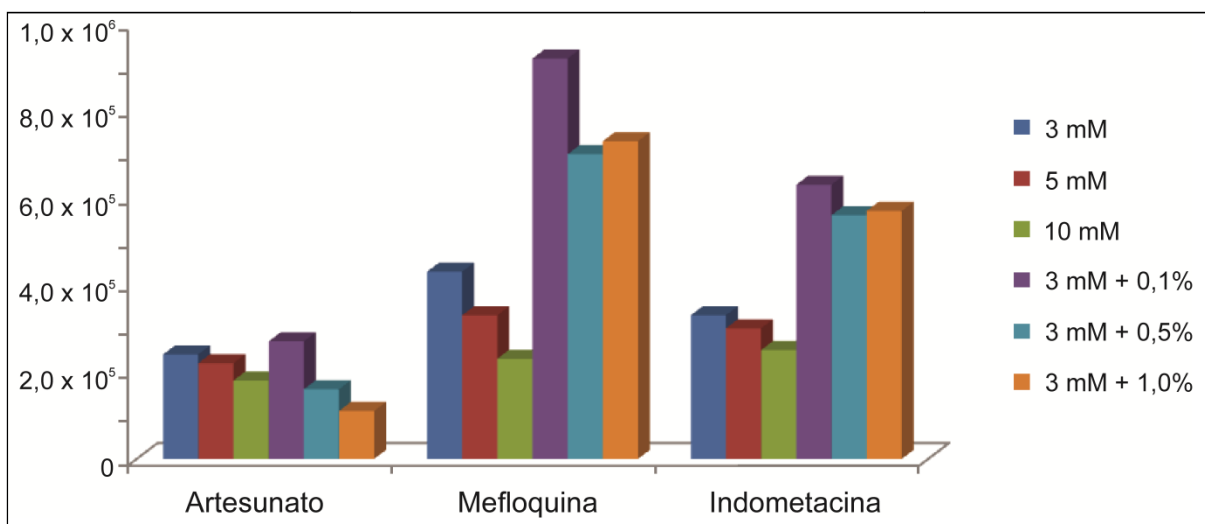


FIGURA 10 – INTENSIDADE DE SINAL DOS IONS PRECURSORES DOS ANALITOS DE INTERESSE E PADRÃO INTERNO, UTILIZANDO DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ADITIVOS

FONTE: O autor (2015).

NOTA: Artesunato -  $[M+NH_4]^+$   $m/z = 402,2$ ; Mefloquina -  $[M+H]^+$   $m/z = 378,9$ ; Indometacina -  $[M+H]^+$   $m/z = 357,9$ . Concentrações:  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$  de Artesunato;  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$  de Mefloquina;  $150 \text{ ng.mL}^{-1}$  de Indometacina.

A concentração de 3 mM de formiato de amônio proporcionou a melhor ionização dos analitos e esta foi avaliada em combinação com o ácido fórmico em diferentes concentrações. Foi verificado que diferentes concentrações de aditivos proporcionaram diferentes respostas de sinal e a concentração de 3 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio e 0,1% de ácido fórmico foi a que promoveu a melhor intensidade de sinal para os analitos. Essa combinação foi escolhida para compor inicialmente o diluente e fase móvel para os testes seguintes.

No entanto foi observado que, após as otimizações dos parâmetros da fonte de ionização e analisador, durante os testes com o cromatógrafo acoplado não houve formação de pico correspondente ao ARS na forma de aduto de amônio. Em um estudo de desenvolvimento de método por CLAE-EM/EM para quantificação de avermectinas (DURDEN, 2007) foi observado que os adutos de sódio são mais

estáveis quando comparados aos adutos de amônio. Sendo assim, como alternativa, novos testes foram realizados avaliando-se o ARS na forma de aduto de sódio.

Tanto para o diluente quanto para a fase móvel foi definido o uso de mistura de acetonitrila, metanol e água, utilizando como aditivo apenas o ácido fórmico a 0,1% (v/v). A adição do metanol foi devido ao fato deste conter traços de sódio, o que contribui para a formação dos adutos de sódio.

#### 4.2.2 Monitoramento de reações múltiplas – MRM.

Uma vez otimizada a ionização dos analitos a próxima etapa foi a realização do experimento de MRM. A concentração dos analitos que promoveu uma intensidade de sinal adequada para realização desse experimento foi de 300 ng.mL<sup>-1</sup> de ARS, 150 ng.mL<sup>-1</sup> de MFQ e 200 ng.mL<sup>-1</sup> de indometacina (PI). Nessas concentrações os parâmetros individuais de cada analito foram otimizados (DP, EP, CEP, CE e CXP) sendo obtidos ao término do experimento dois íons fragmentos mais intensos de cada analito (TABELA 4).

TABELA 4 – PARÂMETROS OTIMIZADOS ATRAVÉS DO EXPERIMENTO DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE CADA ANALITO

ANEXO C						
Ions precursores						
	Artesunato [M+Na] <sup>+</sup>		Mefloquina [M+H] <sup>+</sup>		Indometacina [M+H] <sup>+</sup>	
	407,0		378,9		357,9	
	Ions fragmentos (m/z)					
Parâmetros	261,1 <sup>a</sup>	407,0 <sup>b</sup>	321,1 <sup>a</sup>	271,1 <sup>b</sup>	139,1 <sup>a</sup>	111,1 <sup>b</sup>
CE (V)	21,0	5,0	39,0	47,0	37,0	67,0
CXP (V)	6,0	6,0	24,0	6,0	4,0	4,0
CEP (V)	20,0	20,0	26,0	26,0	34,0	24,0
DP (V)	36	36	51	51	36,0	36,0
EP (V)	4,5	4,5	8,5	8,5	6,0	6,0

FONTE: O autor (2015).

NOTA: V: VOLTS; <sup>a</sup> FRAGMENTOS DE QUANTIFICAÇÃO; <sup>b</sup> FRAGMENTOS DE QUALIFICAÇÃO; CE, ENERGIA DE COLISÃO; CEP, POTENCIAL DE ENTRADA NA CÉLULA DE COLISÃO; CXP, POTENCIAL DE SAÍDA DA CELA; PD, POTENCIAL DE DESAGROPAMENTO; EP, POTENCIAL DE ENTRADA.

#### 4.2.3 Análise por injeção em fluxo - FIA.

Concluído o experimento de MRM os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados através da análise por injeção em fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo ao espectrômetro de massas, sem a necessidade do uso de coluna cromatográfica. Foram otimizados os parâmetros CUR, CAD, GS1, GS2, IS e a temperatura da fonte. Os valores otimizados destes parâmetros são descritos na TABELA 5.

TABELA 5– PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO

Parâmetros da fonte	Modo de ionização positivo
Gás de interface (CUR)	10 psi
Gás de colisão (CAD)	10 psi
Voltagem do capilar (IS)	5500 V
Gás de nebulização (GS1)	40 psi
Gás auxiliar (GS2)	40 psi
Temperatura da fonte (T)	400 °C

FONTE: O autor (2015).

### 4.3 OTIMIZAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

#### 4.3.1 Otimização da cromatografia

O método inicial utilizado para desenvolver a cromatografia foi baseado nos dados da revisão da literatura, ou seja, os diferentes parâmetros cromatográficos observados para os métodos de quantificação do ARS e MFQ foram avaliados e os pontos em comum foram ajustados para as condições disponíveis de equipamentos e materiais.



Inicialmente foi utilizada temperatura de 25°C, com fluxo de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . O modo de eluição foi isocrático, com proporção de 50:50 (v/v) entre fase A e fase B. Como fase A foi usada uma solução de água contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v), como fase B, uma solução de acetonitrila e metanol (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ .

Para a condição cromatográfica inicialmente proposta, os analitos apresentaram alta retenção na coluna. No caso do ARS, o tempo de eluição foi superior a 15 minutos.

Com o objetivo de reduzir o tempo de análise, diferentes composições entre o solvente aquoso e orgânico (fase A e fase B) foram avaliadas. Em adição, variações no fluxo de fase móvel também foram avaliadas, aumentado em até 0,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . A condição que apresentou melhores resultados foi a proporção de 30:70 (fase A:fase B, v/v) e fluxo de 0,35  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Uma melhora significativa no tempo de retenção do ARS foi obtida, aproximando-o da MFQ e PI. O tempo de corrida ficou inferior a 2 minutos. Também houve uma melhora na ionização dos analitos, uma vantagem observada quando se utiliza uma maior proporção de solvente orgânico na fase móvel, a qual proporciona uma alta eficiência de dessolvatação em técnicas de ESI (BUSZEWSKI; NOGA, 2012).

Sabe-se que o alargamento dos picos cromatográficos pode ocorrer por diversos fatores, dentre eles a saturação da capacidade da coluna devido a altas concentrações de analito. Portanto, para manter uma alta eficiência de separação é indicado o uso de baixos volumes de injeção (RUTA *et al.*, 2010). Por isso, o volume de injeção foi reduzido de 10  $\mu\text{L}$  para 5  $\mu\text{L}$ , observando-se uma melhora considerável no perfil dos picos.

A temperatura da coluna é um parâmetro que pode influenciar na separação, afetando a difusão do analito, viscosidade da fase móvel e entalpia de transferência do analito entre a fase estacionária e móvel. Em geral, o aumento de temperatura da coluna pode aumentar o coeficiente de difusão, resultando em picos mais estreitos e, ao mesmo tempo, pode diminuir o tempo de retenção dos analitos (GU *et al.*, 2008). Entretanto, para os analitos em estudo não foram observadas alterações significativas no tempo de retenção e perfil de pico entre as temperaturas de 25°C e 35°C. Sendo assim, optou-se por manter a temperatura da coluna em 25°C.

O método desenvolvido mostrou-se mais vantajoso do que o descrito por NOGUEIRA, *et al.*,(2013). O tempo de análise do método proposto foi de 2 minutos, enquanto que o da literatura apresentou um tempo de 13 minutos, extenso para quantificação de apenas 2 analitos. O uso de coluna de menor comprimento e as otimizações na proporção qualitativa e quantitativa de solventes orgânicos, na fase móvel, proporcionaram tal otimização.

Devido o método por CLAE-EM/EM não apresentar limitação em função da ausência de bons grupos cromóforos, o que é o caso do ARS, este não apresenta restrições quanto ao uso de solventes com alto valor de *cut off*. Os comprimentos de onda selecionado por NOGUEIRA, *et al.* (2013) para quantificação do ARS e MFQ foram de 210 nm e 283 nm, respectivamente. O uso de comprimento de onda na faixa inicial do UV restringe o uso de metanol na fase móvel, por este ter um *cut off* em 205 nm. Ou seja, abaixo desse comprimento de onda o solvente absorve mais que uma unidade de absorbância em uma cela de 1 cm de caminho óptico.

Resumindo, para os analitos em questão, uma cromatografia satisfatória (FIGURA 11) foi obtida utilizando as seguintes condições:

- Coluna cromatográfica XBridge: C18 (50 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m);
- Fase móvel: fase A (água contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v)) e fase B (mistura de acetonitrila e metanol (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v)) na proporção de 30:70 (v/v), respectivamente;
- Fluxo da fase móvel: 0,35 mL.min<sup>-1</sup>;
- Volume de injeção: 5  $\mu$ L;
- Temperatura da coluna: 25 °C;
- Solução de limpeza do sistema de injeção da amostra: 200  $\mu$ L de solução acetonitrila/metanol 1:1 (v/v).
- Fonte de ionização: ESI operando no modo positivo de ionização;
- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): 5500 V, temperatura: 400 °C, gás de interface (CUR): 10 psi, gás de colisão (CAD): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 40 psi e gás auxiliar (GS2): 40 psi;
- Aquisição dos dados: MRM com *dwell time* de 350 ms.

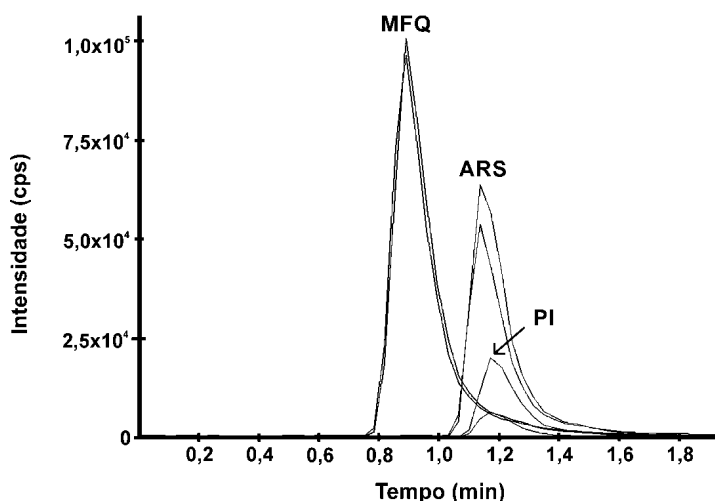


FIGURA 11 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE TRABALHO DE PADRÕES NO MÉTODO FINAL

FONTE: O autor (2015).

NOTA: CONDIÇÕES CROMATOGRAFICAS: COLUNA: XBridge: C18 (50 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m), VOL. DE INJEÇÃO: 5  $\mu$ l; FLUXO: 0,35 mL.min<sup>-1</sup>; ELUIÇÃO: ISOCRÁTICO; TEMP. COLUMNA: 25°C. FASE MÓVEL: SOLUÇÃO A (ÁGUA CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)) E SOLUÇÃO B (MISTURA DE ACETONITRILA E METANOL (1:1, v/v) CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO (v/v)). CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TRABALHO: 500 ng.mL<sup>-1</sup> DE ARTESUNATO, 1000 ng.mL<sup>-1</sup> DE MEFLOQUINA E 100 ng.mL<sup>-1</sup> DE INDOMETACINA. MFQ, MEFLOQUINA; ARS, ARTESUNATO; PI, INDOMETACINA.

#### 4.3.2 Teste de efeito residual (*carryover*)

Como mostrado na FIGURA 12, a combinação de acetonitrila e metanol (1:1, v/v) promoveu uma efetiva limpeza no sistema de injeção, visto que nenhum resíduo foi evidenciado no branco após a injeção de uma amostra na concentração correspondente ao limite superior de quantificação (LSQ) para MFQ, ARS e 100 ng.mL<sup>-1</sup> de PI.

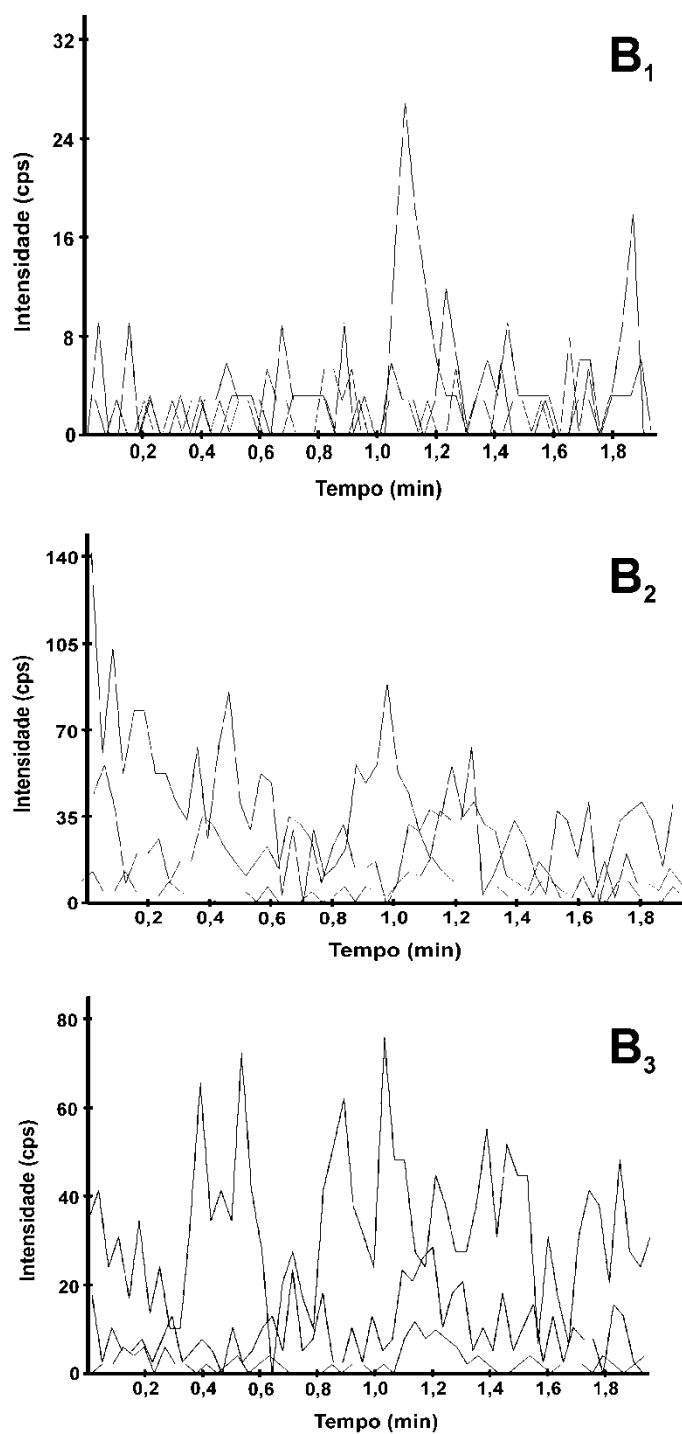


FIGURA 12 – CROMATOGRAMAS DE AVALIAÇÃO DE EFEITO RESIDUAL OBTIDOS POR CLAE-EM/EM: BRANCO ( $B_1$ ) E PRIMEIRA ( $B_2$ ) E SEGUNDA ( $B_3$ ) INJEÇÕES DE BRANCO APÓS INJEÇÃO DA AMOSTRA NA CONCENTRAÇÃO LSQ  
FONTE: O autor (2015).

#### 4.3.3 Otimização do preparo da amostra

A otimização do preparo da amostra foi avaliada comparando-se os resultados obtidos para amostras extraídas sob diferentes tempos de banho de ultrassom. Tanto para a amostra com 5 minutos, quanto para a com 10 minutos de tempo de banho de ultrassom, foram observados resultados equivalentes de recuperação, mostrando que o tempo de ultrassom não interfere na estabilidade dos analitos. As mesmas amostras foram submetidas a re-extração dos resíduos e para nenhuma delas foi observada a presença de traços de analitos. Dessa forma conclui-se que o tempo de 5 minutos de banho de ultrassom foi suficiente para o processo extrativo no preparo da amostra.

### 4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-EM/EM

#### 4.4.1 Seletividade

Quando as inclinações das curvas de regressão linear são equivalentes, o único efeito de matriz presente é a interferência natural causada pelo nível básico do analito. Portanto pode-se afirmar que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, sendo o método seletivo. Comparando-se os coeficientes angulares da curva analítica dos padrões e da curva de amostra adicionada de padrão, observa-se o paralelismo entre elas (FIGURA 13 e 14). A verificação dessa característica foi obtida pela avaliação dos coeficientes angulares pelo teste F (*Fischer-Snedecor*) e Teste t de *Student* concluindo-se que não há diferença estatística significativa entre eles, pois valores de p são maiores que 0,05 (ARS,  $p = 0,6762$ ; MFQ,  $p = 0,6468$ ), concluindo-se que o método é seletivo (TABELA 6).

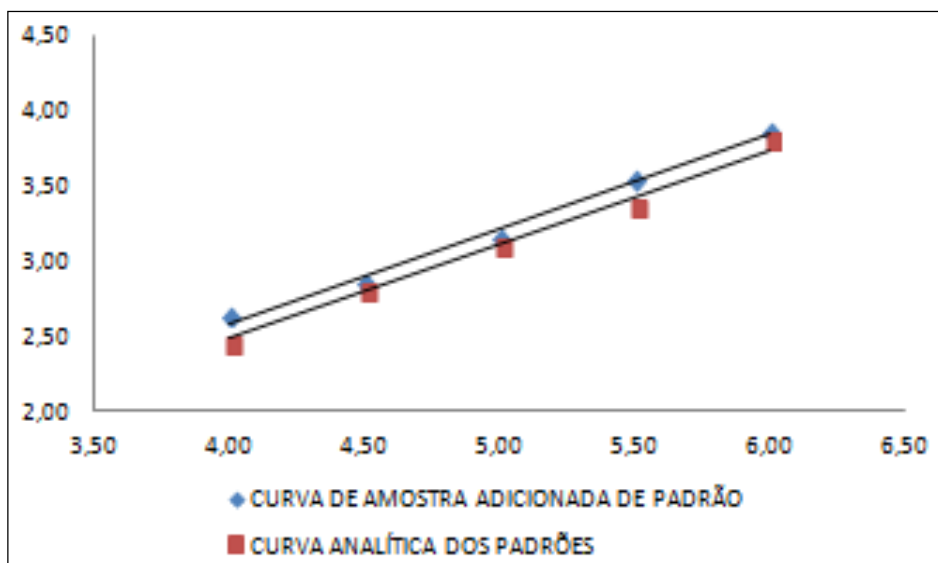


FIGURA 13 – COMPARAÇÃO ENTRE CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO DE ARTESUNATO  
 FONTE: O autor (2015).

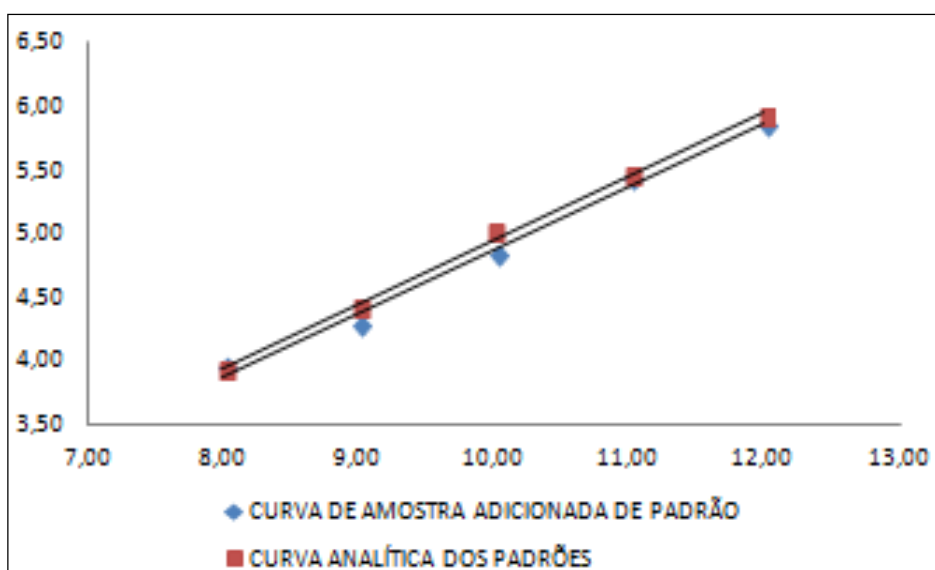


FIGURA 14 – COMPARAÇÃO ENTRE CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO DE MEFLOQUINA  
 FONTE: O autor (2015).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE COEFICIENTES ANGULARES DA CURVA ANALÍTICA DOS PADRÕES E CURVA DE AMOSTRA ADICIONADA DE PADRÃO

Analito	Curva	Coeficiente angular	Média ± dp	DPR %	Variância	Valor- <i>p</i> <sup>*</sup>
ARS	CA	0,6594	0,6570±0,0041	0,63	1,70E-05	0,676
		0,6524				
		0,6597				
	CAP	0,6327	0,6500±0,0263	4,04	6,91E-04	
		0,6365				
		0,6800				
MFQ	CA	0,5321	0,5230±0,0089	1,70	7,90E-05	0,647
		0,5215				
		0,5144				
	CAP	0,4920	0,5120±0,0346	6,75	1,20E-03	
		0,4930				
		0,5524				

FONTE: O autor (2015).

NOTA: NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95% PARA TESTE t DE STUDENT; ARS, ARTESUNATO; CA, CURVA ANALÍTICA; CAP, CURVA ANALÍTICA ADICIONADA DE PADRÃO; dp, DESVIO PADRÃO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO; MFQ, MEFLOQUINA.

#### 4.4.2 Linearidade e intervalo

Três curvas de calibração independentes foram construídas a fim de confirmar a relação linear entre a razão das áreas dos picos dos analitos/área do pico do padrão interno *versus* a razão das concentrações dos analitos/concentração do padrão interno. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, obtendo-se a equação da reta e coeficiente de correlação (FIGURA 15). As curvas realizadas apresentaram coeficiente de correlação (*r*) maiores que 0.99, indicando uma boa correlação linear.

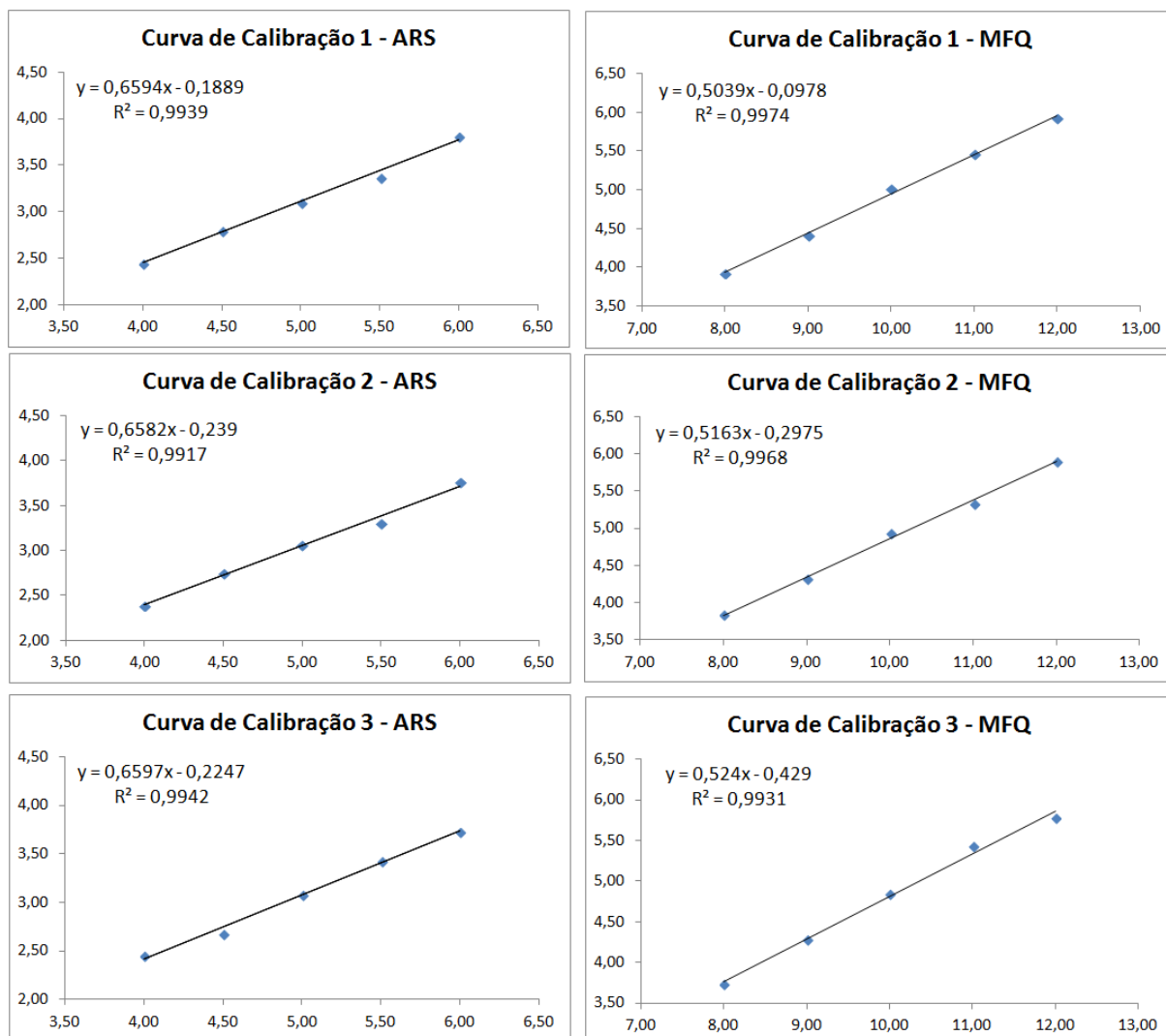


FIGURA 15 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA

FONTE: O autor (2015).

NOTA: EIXO Y: RAZÃO DA ÁREA DO ANALITO PELA ÁREA DO PADRÃO INTERNO; EIXO X: RAZÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ANALITO PELA CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO INTERNO.

Valores de precisão e exatidão para os diferentes níveis de concentração da curva também foram avaliados para ambos os analitos. A precisão apresentou valores de DPR menores que 2% enquanto que a exatidão variou entre 98 e 102%, ou seja, valores considerados baixos demonstrando que o método é preciso e exato (TABELA 7).

A avaliação dos gráficos dos resíduos (FIGURA 16) mostra que há um comportamento aleatório na distribuição dos pontos ao redor do eixo x, na apresentando nenhum comportamento regular ou tendência.



TABELA 7 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA

Analito	Concentração esperada (ng.mL <sup>-1</sup> )	Concentração determinada (ng.mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Precisão (DPR %)	Exatidão (%) <sup>b</sup>
Artesunato	400,00	401,65	0,87	100,41
	450,00	449,17	1,70	99,81
	500,00	500,88	0,22	100,18
	550,00	544,14	1,61	98,93
	600,00	604,16	0,78	100,69
Mefloquina	800,00	797,05	0,42	99,63
	900,00	897,77	0,74	99,75
	1000,00	1010,85	0,40	101,09
	1100,00	1103,94	1,26	100,36
	1200,00	1192,77	0,76	99,40

FONTE: O autor (2015).

NOTA: <sup>a</sup> VALOR MÉDIO DOS RESULTADOS OBSERVADOS PARA CADA PONTO DAS 3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO; <sup>b</sup> VALOR MÉDIO DOS RESULTADOS OBTIDOS PARA CADA PONTO DAS 3 CURVAS DE CALIBRAÇÃO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO.

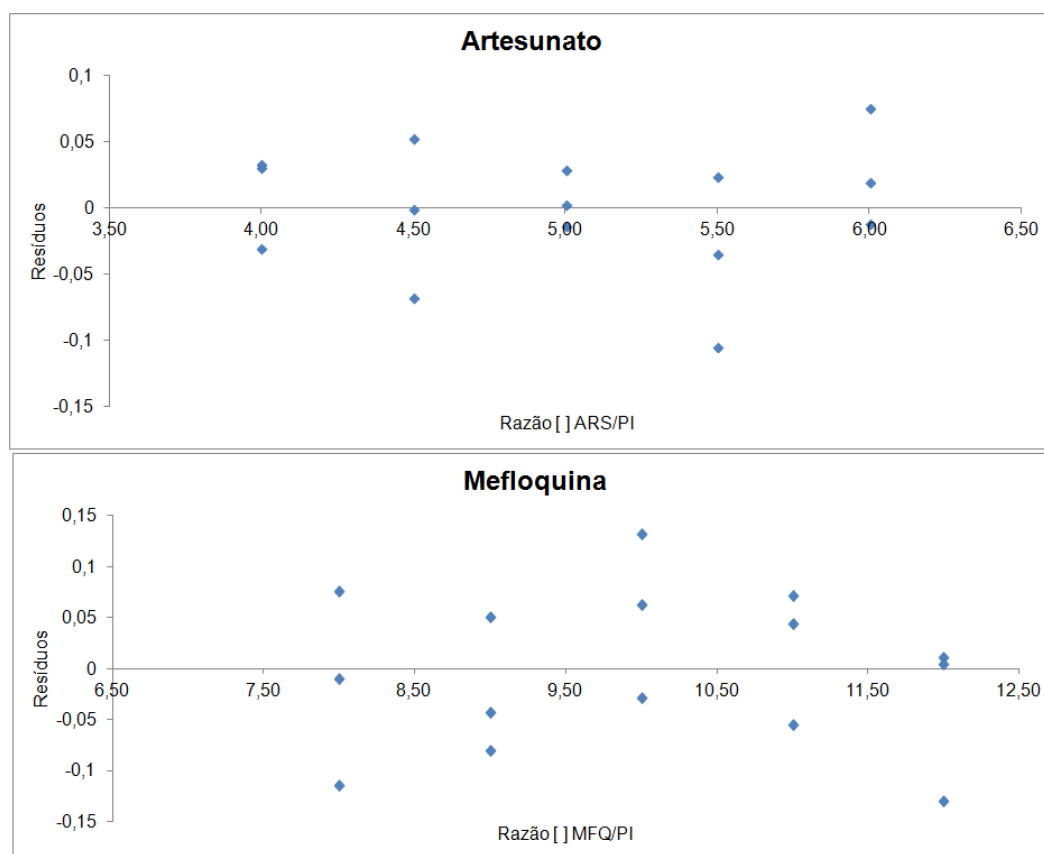


FIGURA 16 – GRÁFICOS DE DISTRIBUIÇÃO DE RESÍDUOS DOS PONTOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA O ARTESUNATO E MEFLOQUINA

FONTE: O autor (2015).

NOTA: [ ], CONCENTRAÇÃO; ARS, ARTESUNATO; MFQ, MEFLOQUINA; PI, PADRÃO INTERNO.

O intervalo de trabalho compreendeu entre 80% a 120% da concentração de 500 ng.mL<sup>-1</sup> (ARS) e 1000 ng.mL<sup>-1</sup> (MFQ).

#### 4.4.3 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas realizando-se 6 análises de determinação para uma mesma amostra, a 100% da concentração, sendo que as análises da precisão intermediária foram executadas por um segundo analista em um intervalo de 2 dias. Conforme mostrado na TABELA 8, os DPR obtidos para as amostras analisadas foram < 5% tanto para ARS quanto para a MFQ. Além disso, obteve-se valor de  $p > 0,05$  para ambos os analitos, indicando que as médias comparadas são estatisticamente equivalentes. O método foi considerado preciso, já que desvios dentro dos limites foram obtidos no ensaio de repetibilidade e precisão intermediária.

TABELA 8 – RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR CLAE-EM/EM

Analito	Determinação	Repetibilidade			Precisão Intermediária				
		Teor %	Média ±dp	DPR % (n=6)	Teor %	Média ±dp	DPR % (n=6)	DPR % (n=12)	Valor- $p^*$
ARS	1	96,38			98,68				
	2	93,93			97,23				
	3	96,08	96,01	1,91	98,53	98,18	1,66	2,01	0,05517
	4	99,31	±1,84		96,79	±1,63			
	5	94,96			101,06				
	6	95,38			96,02				
MFQ	1	101,36			98,06				
	2	97,08			96,46				
	3	99,31	100,29	1,82	103,82	99,57	2,49	2,11	0,57956
	4	102,17	±1,83		100,21	±2,48			
	5	100,88			99,80				
	6	100,95			99,10				

FONTE: O autor (2015).

NOTA: \*TESTE t DE STUDENT (ARS:  $t_{\text{calc}}:-2,1699$ ; MFQ:  $t_{\text{calc}}:-0,5726$ ;  $t_{\text{tab}}:2,2281$ ), NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%; ARS, ARTESUNATO; dp, DESVIO PADRÃO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO; MFQ, MEFLOQUINA.

#### 4.4.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, comparando-se a porcentagem de recuperação da concentração de cada analito com a respectiva concentração teórica. Os valores de exatidão obtidos foram satisfatórios, com recuperações de 95,93 – 103,52% (ARS), 99,78 – 104,91% (MFQ), como pode ser observado na TABELA 9, considerando-se assim o método exato.

TABELA 9 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR CLAE-EM/EM

Analito	Nível	Concentração nominal (ng.mL <sup>-1</sup> )	Concentração obtida (ng.mL <sup>-1</sup> ) ± dp	Recuperação (%) ± dp
ARS	Baixo	400	403 ± 2,46	100,85 ± 0,62
			404 ± 2,22	101,03 ± 0,56
			423 ± 2,53	104,31 ± 0,77
	Médio	500	514 ± 12,74	102,71 ± 2,55
			508 ± 6,97	101,55 ± 1,39
			515 ± 11,43	103,05 ± 2,29
	Alto	600	617 ± 15,04	102,74 ± 2,31
			624 ± 4,99	103,93 ± 0,83
			626 ± 12,99	103,62 ± 1,12
MFQ	Baixo	800	765 ± 3,89	95,03 ± 0,49
			768 ± 1,39	95,98 ± 0,17
			811 ± 13,62	101,32 ± 1,70
	Médio	1000	988 ± 12,86	98,79 ± 1,29
			963 ± 4,31	96,27 ± 0,43
			1009 ± 23,61	100,94 ± 2,36
	Alto	1200	1203 ± 15,37	100,26 ± 1,28
			1228 ± 8,01	102,29 ± 0,67
			1227 ± 23,51	102,22 ± 1,96

FONTE: O autor (2015).

NOTA: ARS, ARTESUNATO; dp, DESVIO PADRÃO; MFQ, MEFLOQUINA.

#### 4.4.5 Teste de estabilidade

##### 4.4.5.1 Teste de estabilidade das soluções estoque

A estabilidade foi avaliada através de ferramentas estatísticas de Teste F e Teste t para comparação dos resultados de cada analito em estabilidade com amostras recém-preparadas.

Conforme apresentado na TABELA 10, soluções estoque dos analitos de interesse quando armazenadas em freezer (-40°C) permaneceram estáveis durante todo o período avaliado (30 dias) (ARS,  $p = 0,1868$ ; MFQ,  $p = 0,8634$ ). Também foi obtida estabilidade dessas soluções por um período de até 6h quando em temperatura de 25°C (ARS,  $p = 0,0543$ ; MFQ,  $p = 0,0865$ ).

TABELA 10 – RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Analito	Concentração nominal (%)	Condições do estudo	Estabilidade (n=3)		
			Precisão (DPR %)	Recuperação %	Valor- $p^*$
ARS	100,81 ± 1,42	14 dias (-40°C)	0,94	97,47 ± 0,92	0,0595
		30 dias (-40°C)	0,79	98,53 ± 0,78	0,1868
		6 h (25°C)	0,38	97,74 ± 0,38	0,0543
MFQ	99,68 ± 1,65	14 dias (-40°C)	1,44	98,24 ± 1,41	0,2343
		30 dias (-40°C)	0,55	99,82 ± 0,78	0,8634
		6 h (25°C)	0,51	96,91 ± 0,49	0,0865

FONTE: O autor (2015).

NOTA: \* TESTE t DE STUDENT (ARS 14 dias:  $t_{\text{calc}}$ : 2,6090; MFQ 14 dias:  $t_{\text{calc}}$ : 1,3992; ARS 30 dias:  $t_{\text{calc}}$ : 1,5912; MFQ 30 dias:  $t_{\text{calc}}$ : 0,1833; ARS 6h:  $t_{\text{calc}}$ : 2,6969; MFQ 6h:  $t_{\text{calc}}$ : 2,2621;  $t_{\text{tab}}$ : 2,7764), NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%; ARS, ARTESUNATO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO; MFQ, MEFLOQUINA.

#### 4.4.5.2 Teste de estabilidade das soluções de trabalho

Soluções de padrão e amostras foram mantidas sob temperatura de 8°C, ao abrigo da luz, por períodos de 24 horas. A estabilidade das soluções de trabalho foi avaliada através de ferramentas estatísticas ferramentas estatísticas de Teste F e Teste t. Como resultado de referência para comparação, os padrões e amostras foram imediatamente analisados após o preparo obtendo-se os resultados de tempo zero.

Conforme apresentado na TABELA 11, soluções de padrões armazenadas a 8°C e abrigo da luz permaneceram estáveis durante o período de 24 horas, nenhum analito apresentou degradação nas condições avaliadas (Solução Padrão: ARS,  $p = 0,0968$ ; MFQ,  $p = 0,1875$  – Solução Amostras: ARS,  $p = 0,3479$ ; MFQ,  $p = 0,6454$ ), possibilitando, assim, serem determinados com segurança durante a análise.

TABELA 11 – RESULTADOS DO TESTE DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

Analito	Concentração nominal (%)	Condições do estudo	Estabilidade (n=3)		
			Precisão (DPR %)	Recuperação %	Valor- $p^a$
ARS	100,81 $\pm$ 1,42	Padrão 24h gerenciador de amostras (8°C)	0,50	98,14 $\pm$ 0,49	0,0968
	99,31 $\pm$ 1,81	Amostra 24h gerenciador de amostras (8°C)	0,71	98,81 $\pm$ 0,69	0,3479
MFQ	99,68 $\pm$ 1,65	Padrão 24h gerenciador de amostras (8°C)	0,18	98,11 $\pm$ 0,17	0,1875
	96,08 $\pm$ 1,85	Amostras 24h gerenciador de amostras (8°C)	0,47	100,57 $\pm$ 0,45	0,6454

FONTE: O autor (2015).

NOTA: TESTE t DE STUDENT (ARS padrão:  $t_{\text{calc}}$ : 2,1612; MFQ padrão:  $t_{\text{calc}}$ : 1,9712; ARS amostra:  $t_{\text{calc}}$ : 1,0623; MFQ amostra:  $t_{\text{calc}}$ : -0,4968;  $t_{\text{tab}}$ : 2,7764), NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%; ARS, ARTESUNATO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO; MFQ, MEFLOQUINA.

## 4.5 MODELOS DESENVOLVIDOS POR CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

### 4.5.1 Obtenção do modelo por calibração multivariada no infravermelho médio (IVM)

Os espectros na região do IVM das 37 amostras preparadas foram adquiridos na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e estão representados na FIGURA 17. Como se pode observar os dados estão destacados entre amostras do conjunto de calibração e amostras do conjunto de validação. Nota-se que, de acordo com o planejamento experimental utilizado, as amostras de calibração são as mais externas (linhas vermelhas) e as de validação (linhas pretas) são as mais internas. Assim, nenhuma amostra de validação está posicionada nas extremidades, fato que evita um erro de quantificação por uma possível extrapolação.

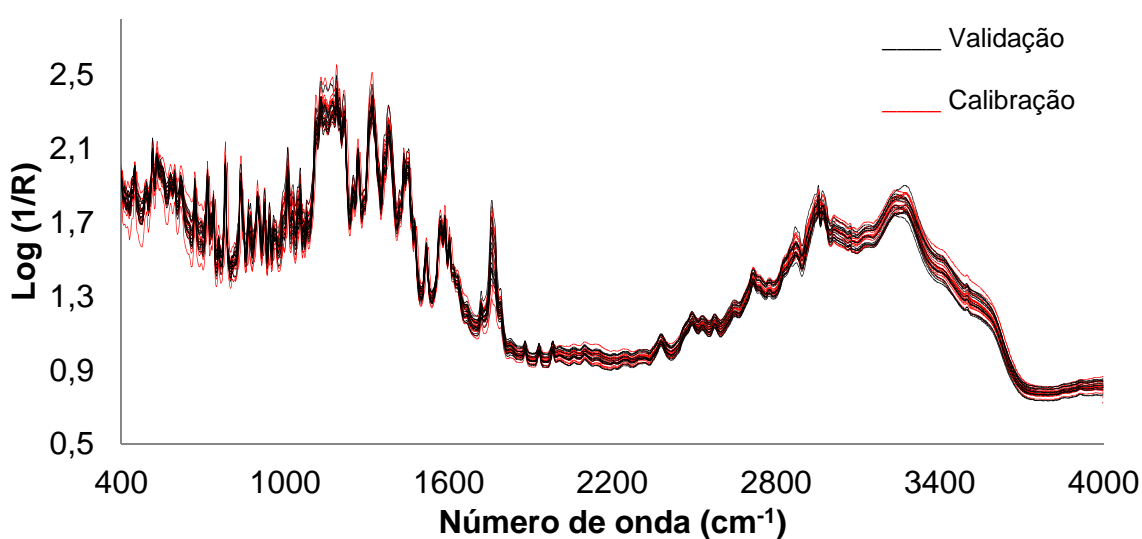


FIGURA 17 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DAS AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (---) E VALIDAÇÃO (----)  
FONTE: O AUTOR (2015).

Da mesma forma que para as amostras, também foi realizada a aquisição dos dados espectrais de um branco para a definição do ruído instrumental, para isso foram feitas leituras da cela de infravermelho vazia. Como se observa na FIGURA 18 a intensidade de absorção é insignificante na faixa de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

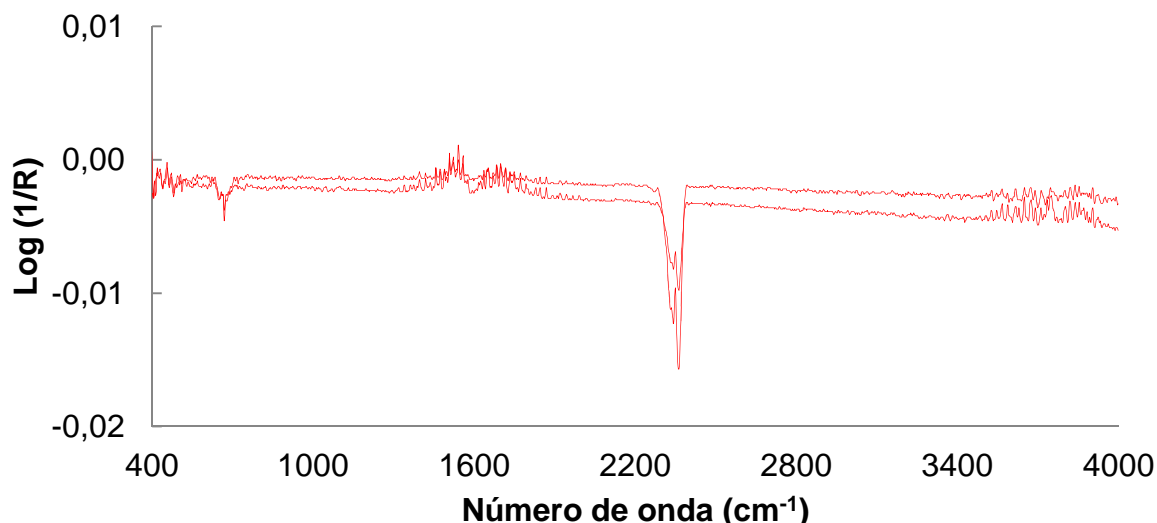


FIGURA 15 – ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO MÉDIO DO BRANCO (CELA SEM ANALITOS)  
 FONTE: O AUTOR (2015).

Para a construção dos modelos os dados espectrais foram tabulados para inserção no *software Matlab*, sendo os dados de número de onda e absorvância relacionados na matriz X e os dados de concentração teórica de ambos os analitos na matriz Y.

Diversas possibilidades de modelos foram construídas, inicialmente optou-se por utilizar os espectros inteiros e usar PLS2 para a quantificação dos dois fármacos em simultâneo. Aspectos fundamentais como utilização de diferentes pré-processamentos e suas combinações mais apropriadas, além de seleção do número de variáveis latentes, foram avaliadas. Todos os modelos construídos tiveram a validação cruzada realizada utilizando-se o método *leave-one-out*.

Além da construção de modelos usando o espectro inteiro, também usou-se como estratégia testar modelos focando na seleção de características inerentes a cada analito, como bandas de absorção específicas. Neste caso, tanto a técnica *siPLS2* quanto *iPLS2* foram avaliadas para desenvolver os modelos, testando-se sob as mesmas condições usadas para PLS2. Para *siPLS2*, os parâmetros específicos da técnica foram definidos com o número de intervalos automático, número de variáveis latentes (máximo igual a 3), modo *forward* e o tamanho do intervalo subdividindo a região espectral considerando-se intervalos de tamanho 319, 255, 213, 182, 159 e 91  $\text{cm}^{-1}$ . Para o *iPLS2*, os parâmetros foram os mesmo do *siPLS2*.

Além de utilizar num primeiro momento a quantificação em simultâneo dos dois fármacos (PLS2, *s*PLS2 e *i*PLS2, na construção e obtenção dos modelos também foram utilizadas as técnicas de PLS1, *s*PLS1 e *i*PLS1 para a quantificação dos fármacos em separado. Todos os parâmetros de pré-processamentos, entre outros, foram os mesmos usados para a avaliação dos fármacos em simultâneo.

A avaliação de todos os modelos construídos foi baseada nos melhores resultados de *RMSEC*, *RMSECV*, *RMSEP* e erro percentual médio de predição. Ou seja, comparou-se os valores para todos os modelos obtidos, e aqueles com menores resultados foram escolhidos, tendo em vista também o número mais adequado de variáveis latentes e presença de amostras anômalas.

O modelo que apresentou resultados mais satisfatórios foi o PLS2, utilizando o espectro inteiro de absorção (400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ). Para o bloco X foi utilizada a combinação dos pré-processamentos: primeira derivada com alisamento Savitzky-Golay, seguido de MSC e centrar dados na média. Para o bloco Y foi utilizado o pré-processamento centrar dados na média. A validação cruzada foi feita utilizando o método *leave-one-out* e o uso de 3 variáveis latentes ficou definido como mais adequado.

Para a escolha do número de variáveis latentes, avaliou-se a relação entre os valores de *RMSECV* versus o número de VL para ambos os fármacos e o valor escolhido foi 3. Esse número de VL foi o que produziu o menor *RMSECV* sem perder significativamente a variância dos dados. Em função do número mínimo recomendado de amostras de calibração e validação para modelos quantitativos multivariados no infravermelho ASTM (2012), o número de VL foi assegurado.

Na análise de amostras anômalas, considerando o critério para resíduos de Student e *Leverage*, no modelo desenvolvido para a associação não foram identificados amostras anômalas, uma vez que nenhuma amostra apresentou simultaneamente valores de *Leverage* maiores que 0,36 ( $3\text{VL}/n$ ) e resíduos de Student maiores que  $\pm 2,5\%$  (FIGURA 19).



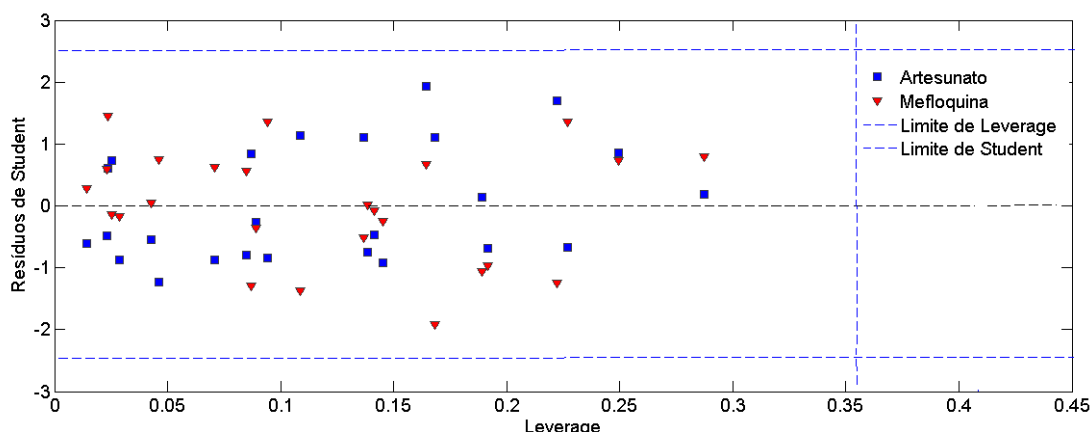


FIGURA 16 – AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE AMOSTRAS ANÔMALAS NO MODELO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR IVM  
FONTE: O AUTOR (2015).

O modelo proposto apresentou variância total de 89,91% para o bloco X e 80,98% para o bloco Y. Os erros de predição foram de 0,75 % para o ARS e 3,71% para a MFQ. Após todos os critérios terem sido avaliados, outros parâmetros observados para o melhor modelo são apresentados na TABELA 12.

TABELA 12 – RESUMO DOS PARÂMETROS ANALISADOS PARA O MELHOR MODELO DESENVOLVIDO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR IVM

Fármaco	R <sup>2</sup>	RMSEC <sup>a</sup>	RMSECV	RMSEP <sup>a</sup>
ARS	0,92	1,59	2,10	0,87
MFQ	0,85	2,85	3,63	1,91

FONTE: O AUTOR (2015).

NOTA: <sup>a</sup> UNIDADE EM mg.100mg<sup>-1</sup>; ARS, ARTESUNATO; MFQ, MEFLOQUINA; IVM, INFRAVERMELHO MÉDIO; R<sup>2</sup>, COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO; RMSEC, RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO DE CALIBRAÇÃO; RMSECV, RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO DE VALIDAÇÃO CRUZADA; RMSEP, RAIZ QUADRADA DO ERRO MÉDIO QUADRÁTICO DE PREVISÃO.

#### 4.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO POR CALIBRAÇÃO MUTIVARIADA

Uma vez que o modelo de calibração multivariada foi desenvolvido, a validação analítica é essencial antes de sua aplicação na avaliação da qualidade de

formulações. A validação foi realizada considerando as figuras de mérito aplicáveis aos modelos multivariados de calibração, conforme item 3.5.

#### 4.6.1 Seletividade

A interpretação do conceito de seletividade para métodos multivariados é diferente em relação aos métodos univariados, e não tem interesse prático para fins de controle de qualidade. A definição é apenas útil dentro de um determinado grupo de amostras de composição qualitativa semelhante, e sua estimativa indica aproximadamente quanto do sinal analítico foi utilizado para estimar a concentração de cada um dos analitos. No caso do método proposto, foram estimados que 28,7% e 34,4% do sinal analítico foram usados para prever as concentrações de ARS e MFQ, respectivamente.

#### 4.6.2 Linearidade

A avaliação deste parâmetro em calibração multivariada utilizando PLS é problemática, uma vez que as variáveis são decompostas pelas variáveis latentes. Assim, uma medida quantitativa para a linearidade não corresponde a uma tarefa simples (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009). Não existem curvas de calibração (sinal analítico x concentração) para modelos multivariados.

Os valores dos coeficientes de correlação para o ARS e MFQ, obtidos através do gráfico dos valores de referência versus os valores previstos, foram 0,90 e 0,91, respectivamente. Tendo em vista a complexidade das matrizes e do fato de a técnica ser capaz de quantificar os fármacos simultaneamente, os valores dos coeficientes de correlação podem ser considerados satisfatórios por serem superiores ao mínimo exigido pela norma do INMETRO, que é de 0,90. Porém nem todos atenderem o valor mínimo exigido pela norma da ANVISA, que é de 0,99.

Qualitativamente, é possível avaliar a linearidade através da avaliação da distribuição do gráfico de resíduos dos erros das amostras do conjunto de calibração e validação, que deve ter um comportamento aleatório. Nesse caso observa-se ausência de tendências e um comportamento aleatório na distribuição dos erros (FIGURA 20 e 21).

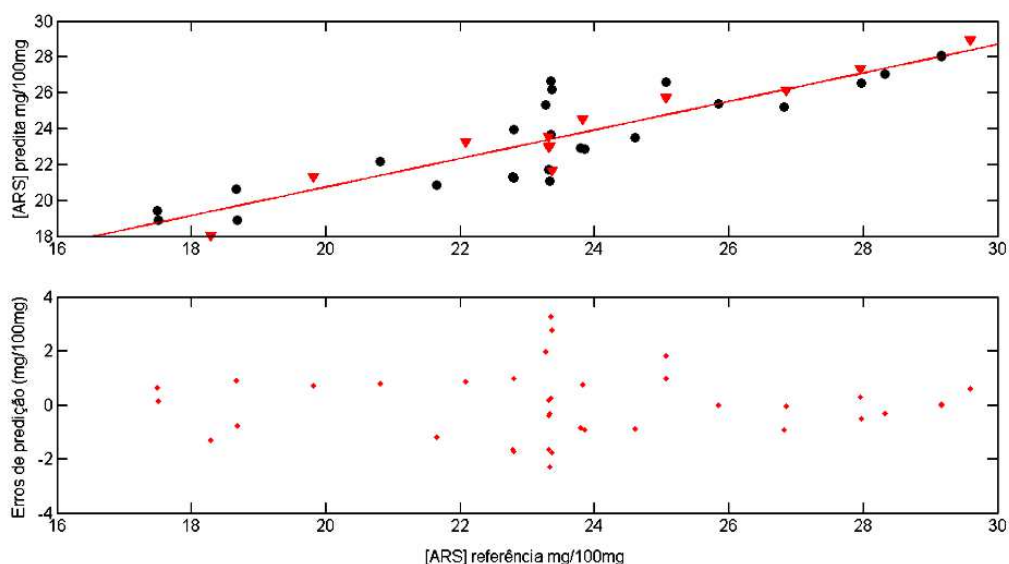


FIGURA 20 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA RELAÇÃO ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA VS. VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 PARA ARTESUNATO (ARS)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (●) E VALIDAÇÃO (▼)

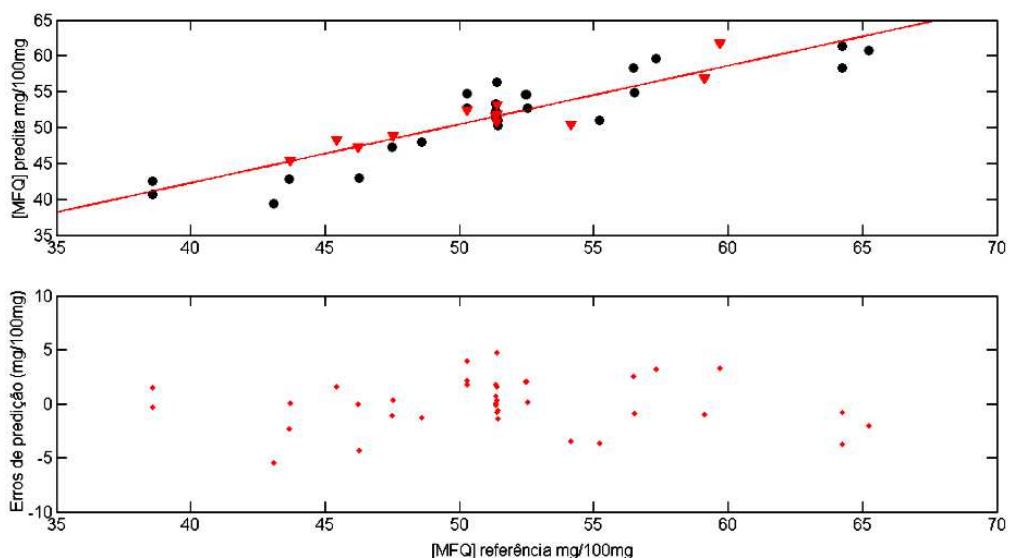


FIGURA 21 – AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE PELA RELAÇÃO ENTRE VALORES DE REFERÊNCIA *VERSUS* VALORES PREDITOS E DISTRIBUIÇÃO DOS RESÍDUOS NO MODELO IVM-PLS2 PARA MEFLOQUINA (MFQ)

FONTE: O autor (2015)

NOTA: AMOSTRAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO (●) E VALIDAÇÃO (▼)

#### 4.6.3 Sensibilidade e sensibilidade analítica

Como o valor puro da sensibilidade não é apropriado para a comparação com outros métodos, os seus valores foram divididos pela estimativa do ruído instrumental ( $\varepsilon = 0,0037$ ) e a sensibilidade analítica foi estimada ( $\gamma$ ). O inverso da sensibilidade analítica ( $\gamma^{-1}$ ) indica a mínima diferença de concentração que o método é capaz de discriminar, considerando o ruído instrumental aleatório como única fonte de erros. O ruído apresentou valor baixo, não comprometendo os resultados obtidos.

No método desenvolvido os valores de sensibilidade  $\gamma$  e  $\gamma^{-1}$  foram respectivamente: 25,47 mg.100mg<sup>-1</sup> e 0,039 mg.100mg<sup>-1</sup> (ARS) e 35,25 mg.100mg<sup>-1</sup> e 0,028 mg.100mg<sup>-1</sup> (MFQ).

Apesar de não ser necessário para este tipo de método, os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) também foram estimados, sendo: 0,1295 mg.100mg<sup>-1</sup> e 0,3925 mg.100mg<sup>-1</sup> (ARS) e 0,0936 mg.100mg<sup>-1</sup> e 0,2837 mg.100mg<sup>-1</sup> (MFQ). Percebe-se que os valores de LD e LQ foram mais baixos que o determinado para  $\gamma^{-1}$ , mostrando coerência quanto a capacidade de distinção do método.

#### 4.6.4 Precisão

Assim como para métodos univariados, a avaliação da repetibilidade e a precisão intermediária para o método foi avaliada realizando-se 6 análises de determinação de amostra a 100% da concentração do teste, sendo que as análises da precisão intermediária foram executadas por um segundo analista em um intervalo de 2 dias. Conforme mostrado na TABELA 13, os DPR obtidos para as amostras analisadas foram < 5% tanto para ARS quanto para a MFQ. Além disso, obteve-se valor de  $p > 0,05$  para ambos os analitos, indicando que as médias comparadas são estatisticamente equivalentes. O método foi considerado preciso, já que desvios dentro dos limites foram obtidos no ensaio de repetibilidade e precisão intermediária.

TABELA 13 – RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO PARA ARTESUNATO E MEFLOQUINA POR MÉTODO IVM-PLS2

Analito	Determinação	Dia 1			Dia 2			Precisão Intermediária	
		Teor %	Média $\pm$ dp	DPR % (n=6)	Teor %	Média $\pm$ dp	DPR % (n=6)	DPR % (n=12)	Valor- $p^*$
ARS	1	106,48			101,74				
	2	99,55			106,66				
	3	100,44	103,28	2,73	106,57	102,20	3,66	3,12	0,5843
	4	102,81	$\pm 2,82$		100,50	$\pm 3,74$			
	5	105,11			100,49				
	6	105,25			97,21				
MFQ	1	106,58			99,00				
	2	99,37			106,35				
	3	103,57	103,88	2,89	103,52	103,02	2,89	2,79	0,6291
	4	101,86	$\pm 3,01$		100,28	$\pm 2,98$			
	5	104,40			106,07				
	6	107,51			102,90				

NOTA: \*TESTE t DE STUDENT (ARS:  $t_{\text{calc}}$ : -0,5652; MFQ:  $t_{\text{calc}}$ : 0,4982;  $t_{\text{tab}}$ : 2,2281),, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%; ARS, ARTESUNATO; dp, DESVIO PADRÃO; DPR, DESVIO PADRÃO RELATIVO; MFQ, MEFLOQUINA.  
FONTE: O autor (2015).

#### 4.6.5 Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre um valor de referência aceito como verdadeiro e o valor previsto pelo modelo. Para a verificação da exatidão do método utilizou-se os valores de RMSEP, os quais são correlacionados com uma aproximação do erro médio de previsão para amostras de validação. Os valores observados para RMSEP foram de 0,87 mg.100mg<sup>-1</sup> (ARS) e 1,93 mg.100mg<sup>-1</sup> (MFQ). No desenvolvimento do planejamento experimental para o modelo proposto, foi considerando que em cada 100 mg de mistura de componentes da fórmula há 23,3 mg de ARS e 51,4 mg de MFQ (Tabela 3). Dessa forma os valores percentuais para erros de previsão das amostras são 3,70 e 3,75 para ARS

e MFQ, respectivamente, sendo considerados adequados por serem menores que 5%.

#### 4.6.6 Viés e desvio residual da predição

O valor de *bias* foi estimado para as amostras de validação e a avaliação foi feita através de um teste t considerando um intervalo de 95% de confiança. Os valores de t calculados foram de 0,0429 (ARS) e 0,9616 (MFQ), sendo menores que o valor de t tabelado (2,201 para 11 graus de liberdade, teste bicaudal). Dessa forma estima-se que o intervalo sempre conteve o zero, conseqüentemente há ausência de erros sistemáticos nos modelos.

O RPD representa o quão bem um modelo de calibração prevê um conjunto de amostras, sendo a forma mais adequada para avaliar o desempenho de diferentes métodos por calibração multivariada para uma mesma associação. Os valores calculados para as amostras de calibração e validação foram 1,56 e 3,67 (ARS) e 1,89 e 2,58 (MFQ), respectivamente.

Um resumo dos dados observados para a validação são apresentados na TABELA 14.

TABELA 14 – RESUMO DOS PARÂMETROS ESTIMADOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO IVM-PLS2

Figuras de mérito	Parâmetros	Valores	
		ARS	MFQ
Seletividade <sup>a</sup>		28,70	34,40
Linearidade	r (coeficiente de correlação)	0,90	0,91
	Distribuição dos resíduos dos erros das amostras	aleatório	aleatório
Sensibilidade analítica ( $\gamma$ ) <sup>b</sup>		25,47	35,25
$\gamma^{-1}$ <sup>b</sup>		0,04	0,03
LQ <sup>b</sup>		0,39	0,28
LD <sup>b</sup>		0,13	0,09
Precisão	DPR repetibilidade (n = 6)	2,73	2,89
	DPR intermediária (n = 12)	3,12	2,89
	Valor de $p^c$	0,58	0,63
Exatidão	RMSEP <sup>b</sup>	0,87	1,93
Intervalo <sup>b</sup>		17,49 - 29,59	38,56 – 65,23
Bias		-0,03	0,56
RPD	Calibração	1,56	1,89
	Validação	3,67	2,88

NOTA: <sup>a</sup> %; <sup>b</sup> mg.100mg<sup>-1</sup>; <sup>c</sup> TESTE t DE STUDENT, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%;  
 FONTE: O autor (2015).

#### 4.6.7 Quantificação dos fármacos nas amostras reais

Amostras do comprimido comercial foram analisadas em triplicata pelos métodos propostos por IVM-PLS e CLAE-EM/EM. O grau de concordância entre os resultados obtidos pelos métodos foi avaliado e comparado estatisticamente usando um teste t para amostras independentes (TABELA 15).

TABELA 15 - VALORES MÉDIOS DE CONCENTRAÇÃO E DESVIO PADRÃO (dp) NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ARTESUNATO E MEFLOQUINA EM COMPRIMIDOS COMERCIAIS ATRAVÉS DE IVM-PLS2 E CLAE-EM/EM (n = 5)

Fármaco	n	Concentração média $\pm$ dp (n=3) (mg.100mg <sup>-1</sup> de comprimido)		Valor de p <sup>b</sup>
		IVM-PLS	CLAE-EM/EM <sup>a</sup>	
ARS	1	23,40 $\pm$ 0,50	22,84 $\pm$ 0,55	0,2580
	2	22,78 $\pm$ 0,43	22,24 $\pm$ 0,46	0,2199
	3	23,73 $\pm$ 0,27	22,77 $\pm$ 0,55	0,0543
	4	23,20 $\pm$ 1,52	21,55 $\pm$ 0,16	0,1351
	5	22,52 $\pm$ 0,11	22,63 $\pm$ 0,29	0,5503
MFQ	1	49,15 $\pm$ 1,72	50,11 $\pm$ 0,75	0,4276
	2	53,77 $\pm$ 1,91	51,17 $\pm$ 0,89	0,1003
	3	51,67 $\pm$ 1,31	51,06 $\pm$ 0,12	0,4706
	4	54,14 $\pm$ 3,59	52,90 $\pm$ 0,28	0,5836
	5	52,16 $\pm$ 2,55	50,26 $\pm$ 0,13	0,2657

NOTA: n, NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO DO COMPRIMIDO; dp, DESVIO PADRÃO; <sup>a</sup> TEORES OBTIDOS PELO MÉTODO POR CLAE-EM/EM ESTÃO APRESENTADOS EM VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACO EM mg POR 100 mg DE COMPRIMIDO, CONSIDERANDO UM PESO MÉDIO DE 465 mg; <sup>b</sup> TESTE t DE STUDENT, NÍVEL DE CONFIANÇA DE 95%; ARS, ARTESUNATO; MFQ, MEFLOQUINA;  
FONTE: O autor (2015)

De acordo com o teste t, para ambos os analitos, não houve diferença significativa entre os resultados determinados pelos métodos IVM-PLS e CLAE-EM/EM. Na comparação dos resultados as cinco amostras apresentaram valores de p superiores a 0,05 e todos os valores de t calculados foram inferiores aos valores de t crítico ( $t_{\text{crítico}} = 2,7764$ , nível de confiança de 95%). Portanto, pode-se inferir que os valores são estatisticamente equivalentes entre as técnicas.

Durante o desenvolvimento e validação do modelo IVM-PLS2, as amostras do conjunto de validação apresentaram variações dentro dos limites aceitáveis para seus erros relativos, porém levemente maiores que as observadas para o método por CLAE-EM/EM. Possivelmente, essas variações expliquem os valores de dp maiores para as determinações por IVM-PLS frente ao CLAE-EM/EM. Porém, mesmo considerando essas diferenças, o método por calibração multivariada foi capaz de prever resultados equivalentes.

Um ponto que vale salientar é que o modelo por IVM-PLS foi desenvolvido com base em uma formulação proposta pelo presente estudo, devido a ausência de acesso às informações do fabricante com relação à composição quantitativa dos



excipientes presentes no comprimido. Mesmo considerando a possível diferença entre as formulações, o método IVM-PLS mostrou capacidade preditiva equivalente ao método por CLAE-EM/EM.

A técnica IVM-PLS2 proporcionou análises sem utilizar solventes orgânicos, sendo até dez vezes mais rápidos que métodos por CLAE. Além de tratar-se de uma técnica simples com equipamento mais acessível e de baixo custo (manutenções mais baratas).

## **5 CONCLUSÃO**

Neste trabalho, dois métodos diferentes foram desenvolvidos para a determinação de artesunato e mefloquina dose fixa combinada na forma farmacêutica comprimido. Estes métodos mostraram-se adequados para a determinação de teor destes fármacos em comprimidos.

Na avaliação das amostras comerciais, os métodos desenvolvidos forneceram resultados estatisticamente equivalentes. Isto foi possível mesmo sem o acesso à composição quantitativa dos excipientes, que foi um fator limitante no desenvolvimento dos métodos, principalmente no infravermelho. Os métodos desenvolvidos se mostraram adequados para o controle de qualidade desses fármacos, podendo ser aplicados na rotina de laboratórios de controle de qualidade, bem como na indústria no controle de processo de fabricação, além de análises fiscais.

O método CLAE-EM/EM desenvolvido neste trabalho mostrou-se adequado para a finalidade de quantificação simultânea dos fármacos. O método apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis conforme as legislações nacionais e internacionais vigentes. As principais vantagens do método desenvolvido são o tempo de análise (cerca de 2 minutos por corrida) e a fácil extração dos fármacos dos comprimidos.

O método IVM-PLS2 desenvolvido foi considerado satisfatório para a determinação espectroscópica da associação de artesunato e mefloquina em amostras reais da associação farmacêutica, sendo capaz de fornecer resultados estatisticamente equivalentes ao método validado por CLAE-EM/EM. O método

desenvolvido foi validado de acordo com orientações nacionais (ANVISA) e internacionais (ASTM), demonstrando potencial para a finalidade proposta. Os parâmetros de exatidão, precisão, seletividade, sensibilidade, sensibilidade analítica e  $\gamma^{-1}$  foram considerados satisfatórios.

Vale ressaltar que a técnica IVM-PLS2 proporcionou análises sem utilizar solventes orgânicos, sendo até dez vezes mais rápidos que métodos por CLAE. Além de tratar-se de uma técnica simples com equipamento mais acessível e de baixo custo (manutenções mais baratas).

## REFERÊNCIAS

ABDIN, M. Z. *et al.* Artemisinin, a Novel Antimalarial Drug: Biochemical and Molecular Approaches for Enhanced Production. **Planta Med**, v. 69, n. 04, p.289-299, 2003.

AMBLER, M. *et al.* The neurological assessment in young children treated with artesunate monotherapy or artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, v. 8, n. 1, p.207, 2009.

ASTM. **E1655-05: Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis**: West Conshohocken 2012.

ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N. **Optimum experimental designs**. ed: Oxford: Clarendon Press, 1992.

BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n., p.1401-1406, 2006.

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Aplicação de métodos de calibração multivariada para a determinação simultânea de riboflavina (VB2), tiamina (VB1), piridoxina (VB6) e nicotinamida (VPP). **Química Nova**, v. 30, n., p.1638-1643, 2007.

BLANCO, M. *et al.* Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry . Critical Review. **Analyst**, v. 123, n. 8, p.135R-150R, 1998.

BRAGA, E. M.; FONTES, C. J. *Plasmodium*-malária. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p. 143-161.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Química Nova**, v. 27, n., p.1004-1011, 2004.

BRASIL. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 de jun. de 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. REsolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. . Disponível. Acesso em:12/07/2013.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 14, de 31 de maio de 2010. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 de abr. de 2010. . Disponível em:<<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>>. Acesso em:03/03/14.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guia de validação e controle de qualidade analítica: produtos para alimentação e medicamentos

veterinários / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. - Brasília: MAPA/ACS, 2011. 72. Disponível. Acesso.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 de mai. 2012. Disponível. Acesso.

BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, n. 11, p.2125-2154, 2000.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. **Microchimica Acta**, v. 128, n. 1-2, p.93-106, 1998.

BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. "Quimiometria". **Química Nova**, v. 8, n. 84, 1985.

BUSZEWSKI, B.; NOGA, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)--a powerful separation technique. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p.231-47, 2012.

CLARK, R. L. Embryotoxicity of the artemisinin antimalarials and potential consequences for use in women in the first trimester. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p.285-296, 2009.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-81, 2003.

DURDEN, D. A. Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 850, n. 1-2, p.134-46, 2007.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

FERREIRA, M. H.; BRAGA, J. W. B.; SENA, M. M. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, n. 0, p.158-164, 2012.

\_\_\_\_\_. Development and validation of a chemometric method for direct determination of hydrochlorothiazide in pharmaceutical samples by diffuse reflectance near infrared spectroscopy. **Microchemical Journal**, v. 109, n. 0, p.158-164, 2013.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n., p.724-731, 1999.

FORINA, M.; LANTERI, S.; CASALE, M. Multivariate calibration. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p.61-93, 2007.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n., p.1271-1278, 2008.

FRANCESQUETT, J. Z. *et al.* Modelos de regressão multivariada empregando seleção de intervalos para a quantificação do biodiesel em blendas biodiesel/diesel. **Tecno-Logica**, v. 14, n. 2, p.87-92, 2010.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

GU, Y. *et al.* Comparison of HPLC with electrochemical detection and LC-MS/MS for the separation and validation of artesunate and dihydroartemisinin in animal and human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p.213-218, 2008.

GUERIN, P. J. *et al.* Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p.564-573, 2002.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed, 2006.

HE, G. *et al.* LC-MS/MS method for the simultaneous quantitation of three active components derived from a novel prodrug against schistosome infection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 83, n., p.186-93, 2013.

HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. **Spectroscopy Methods in Organic Chemistry**. 2. ed: Thieme, 2008.

HIEN, T. T.; WHITE, N. J. Qinghaosu. **The Lancet**, v. 341, n. 8845, p.603-608, 1993.

HODEL, E. M. *et al.* A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 10, p.867-886, 2009.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed: Bookman, 2009.

HYDE, J. E. Mechanisms of resistance of Plasmodium falciparum to antimalarial drugs. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 2, p.165-174, 2002.

ICH. **Q2A Text on Validation of Analytical Procedures**. ed: London, 1996.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos - DOQ-CGCRE-008. 24. Disponível. Acesso.

KALYANKAR, T. M. *et al.* Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Artesunate and Mefloquine. **Journal of Chemistry**, v. 2013, n., p.5, 2013.

KIPOUROS, K. *et al.* Quantitative analysis of less soluble form IV in commercial carbamazepine (form III) by diffuse reflectance fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and lazy learning algorithm. **Analytica Chimica Acta**, v. 550, n. 1-2, p.191-198, 2005.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, n. 4703, p.1049-1055, 1985.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-1367, 2005.

KRISHNA, S.; UHLEMANN, A.-C.; HAYNES, R. K. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4-5, p.233-244, 2004.

KYEONG-RYOON, L. *et al.* Simultaneous Determination of Artesunate and Dihydroartemisinin Concentrations in Human Plasma by High Performance liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Electro-Spray Ionization. **Analytical Letters**, v. 43, n. 2, p. 226-239, 2010.

LIMA, K. M. G. *et al.* Sensores ópticos com detecção no infravermelho próximo e médio. **Química Nova**, v. 32, n., p.1635-1643, 2009.

LINDEGARDH, N. *et al.* Validation and application of a liquid chromatographic-mass spectrometric method for determination of artesunate in pharmaceutical samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 1, p.149-153, 2007.

\_\_\_\_\_. Major pitfalls in the measurement of artemisinin derivatives in plasma in clinical studies. **Journal of Chromatography B**, v. 876, n. 1, p.54-60, 2008.

\_\_\_\_\_. Quantification of artemisinin in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p.768-773, 2009.

\_\_\_\_\_. Quantification of dihydroartemisinin, artesunate and artemisinin in human blood: overcoming the technical challenge of protecting the peroxide bridge. **Bioanalysis**, v. 3, n. 14, p.1613-1624, 2011.

LUNDSTEDT, T. *et al.* Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1-2, p.3-40, 1998.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p.214-222, 2009.

MS. Ministério da Saúde. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. 36. Disponível em:<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_pratico\\_malaria.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_malaria.pdf)>. Acesso em:23/07/2013.

\_\_\_\_\_. **Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2000 a 2001**. SAÚDE, S. D. V. E.: Ministério da Saúde. 44 2013.

NAIK, H. *et al.* Development and validation of a high performance liquid chromatography mass spectroscopy assay for determination of artesunate and dihydroartemisinin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 816, p.233-242, 2005.

NEWTON, P. N. *et al.* A Collaborative Epidemiological Investigation into the Criminal Fake Artesunate Trade in South East Asia. **PLoS Med**, v. 5, n. 2, p.e32, 2008.

\_\_\_\_\_. Counterfeit anti-infective drugs. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p.602-613, 2006.

NOGUEIRA, F. H. A. *et al.* Quality of essential drugs in tropical countries: evaluation of antimalarial drugs in the Brazilian Health System. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n., p.582-586, 2011.

\_\_\_\_\_. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of artesunate and mefloquine hydrochloride in fixed-dose combination tablets. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p.837-843, 2013.

NUNES, P. G. A. **Uma nova técnica para seleção de variáveis em calibração multivariada aplicada às espectroscopias UV-Vis e NIR**. f. Tese de Doutorado -, UFPB, João Pessoa, 2008.

NYADONG, L. *et al.* Reactive Desorption Electrospray Ionization Linear Ion Trap Mass Spectrometry of Latest-Generation Counterfeit Antimalarials via Noncovalent Complex Formation. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 5, p.2150-2157, 2007.

NYADONG, L. *et al.* Direct Quantification of Active Ingredients in Solid Artesunate Antimalarials by Noncovalent Complex Forming Reactive Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 19, n. 3, p.380-388, 2008.

OLIVEIRA-FERREIRA, J. *et al.* Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal**, v. 9, n. 1, p.115, 2010.

OLIVIERI, A. C. *et al.* Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 3, p.633-661, 2003.

PARISOTTO, G. *et al.* Desenvolvimento de metodologias no infravermelho aplicadas para a quantificação de cloridrato de metformina em formulações farmacêuticas. **Orbital**, v. 1, n. 1, p.38-48, 2009.

PASQUINI, C. Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n., p.198-219, 2003.

PEREIRA, A. D. S. *et al.* Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, n., p.S107-S111, 2005.

PÖLLANEN, K. *et al.* DRIFT-IR for quantitative characterization of polymorphic composition of sulfathiazole. **Analytica Chimica Acta**, v. 544, n. 1-2, p.108-117, 2005.

PRICE, R. *et al.* Pharmacokinetics of Mefloquine Combined with Artesunate in Children with Acute Falciparum Malaria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p.341-346, 1999.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 5. ed: Elsevier, 2005.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n., p.771-780, 2004.

RICCI, C. *et al.* Characterization of genuine and fake artesunate anti-malarial tablets using Fourier transform infrared imaging and spatially offset Raman spectroscopy through blister packs. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 5, p.1525-1532, 2007.

\_\_\_\_\_. Combined Fourier-transform infrared imaging and desorption electrospray-ionization linear ion-trap mass spectrometry for analysis of counterfeit antimalarial tablets. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p.551-559, 2007.

RINNAN, A.; VAN DEN BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p.1201-1222, 2009.

RUTA, J. *et al.* A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 52, p.8230-8240, 2010.

SARRAGUÇA, M. C.; LOPES, J. A. Quality control of pharmaceuticals with NIR: From lab to process line. **Vibrational Spectroscopy**, v. 49, n. 2, p.204-210, 2009.

SCHARDER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy: method and applications**. 1. ed: Wiley-VCH, 1995.

SENA, M. M. **Aplicação de Métodos Quimiométricos de Primeira e Segunda Ordem na Determinação de Fármacos por Espectroscopia Molecular**. f. - Laboratório de Quimiometria em Química Analítica, Unicamp, Campinas, 2004.

SENA, M. M. *et al.* Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 4, p.743-9, 2004.



\_\_\_\_\_. Determinação espectrofotométrica simultânea de paracetamol e ibuprofeno em formulações farmacêuticas usando calibração multivariada. **Química Nova**, v. 30, n., p.75-79, 2007.

SILVA, F. E. *et al.* Simultaneous determination of sulphamethoxazole and trimethoprim in powder mixtures by attenuated total reflection-Fourier transform infrared and multivariate calibration. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p.800-805, 2009.

SILVA, L. H. P. D.; OLIVEIRA, V. E. G. D. O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n., p.49-63, 2002.

SILVA, M. A. M. *et al.* Development and analytical validation of a multivariate calibration method for determination of amoxicillin in suspension formulations by near infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 89, n., p.342-351, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7. ed: John Wiley & Sons, 2005.

SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n., p.223-229, 2012.

STUART, B. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1. ed: John Wiley & Sons, Ltd, 2004.

TAYLOR, R. B.; SHAKOOR, O.; BEHRENS, R. H. Drug quality, a contributor to drug resistance? **The Lancet**, v. 346, n. 8967, p.122, 1995.

TEJA-ISAVADHARM, P. *et al.* A Simplified Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Assay for Artesunate and Dihydroartemisinin, Its Metabolite, in Human Plasma. **Molecules**, v. 15, n. 12, p.8747-8768, 2010.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n., p.338-350, 2006.

TROY, D. B.; REMINGTON, J. P.; BERINGER, P. **Remington: The Science And Practice Of Pharmacy**. ed: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

USP. **The United States Pharmacopoeia**. 36. ed: Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2013.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parametros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**. 135 f. - Departamento de Química Analítica, Unicamp, Campinas, 2005.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, E. M.; POPPI, R. J. Estado da Arte de Figuras de Mérito em Calibração Multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p.1278-1287, 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Variable Selection, Outlier Detection, and Figures of Merit Estimation in a Partial Least-Squares Regression Multivariate Calibration Model. A Case Study for the Determination of Quality Parameters in the Alcohol Industry by Near-Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p.8331-8338, 2007.

VAN BRAMER, S. E. **An introduction to mass spectrometry**. ed: Chester: Widener University, 1997.

VESSMAN, J. *et al.* Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p.1381–1386, 2001.

WHO. **Assessment of the safety of artemisinin compounds in pregnancy**. Disponível Acesso em:31/07/2013.

\_\_\_\_\_. **Countfeit Medicines**. Disponível em:<[http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/impact/ImpactF\\_S/en/index.html#](http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/impact/ImpactF_S/en/index.html#)> Acesso em:23/07/2013.

\_\_\_\_\_. **Guidelines for the treatment of malaria**. Disponível em:<<http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html>> Acesso em:23/07/2013

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2012**. Disponível em:<[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/index.html](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/index.html)> Acesso em:23/07/2013.

\_\_\_\_\_. **Malaria. Fact sheet Nº94**. Disponível em:<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>> Acesso em:23/07/2013.

\_\_\_\_\_. **World Malaria Report 2014**. Disponível em:<[http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/)> Acesso em:25/01/2014.

WILAIRATANA, P. *et al.* The Future Outlook of Antimalarial Drugs and Recent Work on the Treatment of Malaria. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p.416-421, 2002.

WILLIAMS, M. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th Edition Edited by M.J. O'Neil**, PB - Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK ISBN 9781849736701; 2708 pages. April 2013, . ed, 2013.

WORKMAN JR, J.; WORKMAN, J. Practices for Data Preprocessing for Optical Spectrophotometry. In: (Ed.). **The Handbook of Organic Compounds**.ed.: Burlington: Academic Press, 2001. p. 295-300.

XIANG, D. *et al.* Robust calibration design in the pharmaceutical quantitative measurements with near-infrared (NIR) spectroscopy: Avoiding the chemometric pitfalls. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, n. 3, p.1155-66, 2009.